

Aus dem Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und
Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg,
Forschungsschwerpunkt angewandte Tumorstudiologie
Stiftungsvorstand: Prof. Dr. H. Zur Hausen

Funktionelle Charakterisierung des humanpathogenen Papillomvirus Typ 16 E5 Proteins

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Kirsten Kabsch
aus Los Angeles

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 23.04.2003

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Klaus Radsak

1. Coreferent: Prof. Dr. Angel Alonso

2. Coreferent: Prof. Dr. Thomas Iftner

Die Natur kreiert nichts ohne Bedeutung.

Aristoteles (384-322 v. Chr.)

Veröffentlichungen:

1. **Kabsch, K.**, and A. Alonso. 2002. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL - and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. J. Virol. **76**:12162-12172.
2. **Kabsch, K.**, and A. Alonso. 2002. The human papillomavirus type 16 (HPV-16) E5 protein sensitizes human keratinocytes to apoptosis induced by osmotic stress. Oncogene **21**:947-953.
3. Molina, T., **K. Kabsch**, A. Alonso, A. Kohl, G. Komposch, and P. Tomakidi. 2001. Topographic changes of focal adhesion components and modulation of p125^{FAK} activation in stretched human periodontal ligament fibroblasts. J. Dent. Res. **80**:1984-1989.
4. Cheng, H., J. Kartenbeck, **K. Kabsch**, X. Mao, M. Marques, and A. Alonso. 2002. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. J. Cell. Physiol. **192**:234-243.
5. Rodriguez, I., M. Kaszkin, M. M. Marques, **K. Kabsch**, X. Mao, and A. Alonso. 2002. Hyperosmotic stress induces activation of cytosolic phospholipase A₂ in HaCaT cells by an epidermal growth factor receptor-mediated process. Cell. Signal. **14**:839-848.

Veröffentlichungen in Vorbereitung:

1. **Kabsch, K.**, H. Cheng, N. Mossadegh, J. Schenkel, and A. Alonso. The E5 protein of human papillomavirus type 16 modulates stress-mediated signal transduction in human keratinocytes.
2. **Kabsch, K.**, N. Mossadegh, A. Kohl, G. Komposch, J. Schenkel, A. Alonso, and P. Tomakidi. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL - and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. (submitted to Intervirology)

3. Rodriguez, I., A. Holloschi, M. Kaszkin, H. Cheng, **K. Kabsch**, M. Hafner, and A. Alonso. 2002. Hyperosmotic shock activates phospholipase C- γ 1 in human keratinocytes without enzyme phosphorylation. (submitted to Biol. Chem.)

Präsentationen der Arbeit auf Kongressen:

1. **Kabsch, K.**, H. Cheng, and A. Alonso. 2000. HPV-16 E5 modulates activation of the stress-kinases p38 and JNK by growth factor-independent mechanism. (Poster); "Viruses in the etiology of human tumors", DKFZ, Heidelberg.
2. **Kabsch, K.**, H. Cheng, and A. Alonso. 2000. HPV-16 E5 modulates activation of the stress-induced kinases p38 and JNK in human keratinocytes. (Poster); "18th International papillomavirus conference", Barcelona, Spanien.
3. **Kabsch, K.**, N. Mossadegh, A. Kohl, G. Komposch, J. Schenkel, A. Alonso, and P. Tomakidi. 2003. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocytes. (Poster und Vortrag); "Apoptosis 2003", Luxembourg.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Taxonomie	1
1.2.	Medizinische Aspekte	1
1.3.	Biologische Aspekte	2
1.3.1.	Virionstruktur und Genomaufbau	2
1.3.2.	Infektionszyklus	4
1.3.3.	Funktion der viralen Proteine	6
1.3.3.1.	Das HPV-16 E5 Protein	7
1.4.	Signaltransduktion	10
1.4.1.	Aktivierung der MAP Kinasen durch osmotischen Stress	11
1.4.2.	Apoptose	13
1.5.	Problemstellung	16
2.	ABKÜRZUNGEN	17
2.1.	Allgemeine Abkürzungen	17
2.2.	Abkürzungen in der Signaltransduktion	17
2.3.	Synonyme in der Signaltransduktion	18
3.	MATERIAL	20
3.1.	Chemikalien	20
3.2.	Zelllinien	20
3.3.	Bakterien	20
3.4.	Zellkultur-Medien und -Zusätze	20
3.5.	Bakterienkultur	21
3.6.	Plasmide	21
3.7.	Antikörper	21
3.7.1.	Erstantikörper	21
3.7.2.	Zweitantikörper	22
3.8.	Radioaktive Verbindungen	23
3.9.	Enzyme	23
3.10.	Kits	23
3.11.	Verbrauchsmaterialien	23
3.12.	Geräte	24
3.13.	Puffer	24
4.	METHODEN	25
4.1.	Molekularbiologische Methoden	25
4.1.1.	Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Bakterien	25
4.1.2.	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA mit Endonukleasen	25
4.1.3.	Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese	26
4.1.4.	Elution von DNA-Fragmenten	26
4.1.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	26
4.1.6.	Transformation von <i>E.coli</i>	26

4.1.7.	RNA-Extraktion aus HaCaT Zellen	27
4.1.8.	Reverse Transkription (RT)	28
4.1.9.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
4.1.10.	RNA-Agarosegel-Elektrophorese	29
4.1.11.	Northern Blot Analyse	30
4.1.11.1.	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde	31
4.2.	Zellbiologische Methoden	32
4.2.1.	Zellkulturtechniken	32
4.2.1.1.	Kultivierung von HaCaT Zellen als Monolayer	32
4.2.1.2.	Kultivierung von A31 Mausfibroblasten als Monolayer	33
4.2.1.3.	Kultivierung von Cos7 Affennierenepithelzellen als Monolayer	34
4.2.1.4.	Kultivierung von HaCaT Zellen als <i>Raft</i> -Kulturen	34
4.2.1.5.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	35
4.2.2.	Transfektion und transiente Expression in Eukaryonten	36
4.2.2.1.	Transfektion von Cos7 Zellen mit dem FuGENE™ 6 Reagenz	36
4.3.	Proteinchemische Methoden	36
4.3.1.	Herstellung von Zellextrakten	36
4.3.1.1.	SDS-Extrakte	36
4.3.1.2.	E1A-Extrakte	37
4.3.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	38
4.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	38
4.3.4.	Extraktion von Membran- und Cytosolproteinen	39
4.3.5.	Cytochrom c-Freisetzung	40
4.3.6.	GST-Fusionsprotein Aufreinigung	41
4.3.7.	Affinitätspräzipitation der G-Proteine	42
4.3.8.	<i>In vitro</i> Kinaseaktivitäts-Assay	42
4.3.9.	Overlay-Assay	43
4.4.	Immunologische Methoden	44
4.4.1.	Western Blot Analyse	44
4.4.2.	Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation	46
4.4.3.	FACS Analyse	48
4.4.4.	Indirekte Immunfluoreszenz	49
4.4.4.1.	Acetonfixierung	49
4.4.4.2.	Paraformaldehydfixierung	49
4.4.4.3.	Formaldehydfixierung	50
5.	ERGEBNISSE	51
5.1.	Aktivierung der Signaltransduktion durch osmotischen Stress	51
5.1.1.	Nachweis der E5 mRNA Expression in HaCaT/E5 Zellen	51
5.1.2.	Die <i>in vitro</i> Kinaseaktivität von p38 und JNK ist nach Sorbitol-Behandlung in HaCaT/E5 Zellen reduziert	53
5.1.3.	Die Mengen an GTP-Cdc42 und GTP-Rac1 sind höher in HaCaT/E5 Zellen als in HaCaT/pMSG	54
5.1.4.	Cdc42 liegt in HaCaT/E5 nach Sorbitol-Behandlung stärker membranassoziiert vor als in HaCaT/pMSG	55
5.1.5.	Die Inhibierung der G-Proteine durch Toxin B hat keinen negativen Effekt auf die Aktivierung von p38 und JNK nach Sorbitol-Behandlung	57

5.1.6.	Untersuchungen zur direkten Interaktion zwischen HPV-16 E5 und den G-Proteinen Rac1 bzw. Cdc42	58
5.1.7.	HaCaT/pMSG und E5 Zellen zeigen Unterschiede in der Actin-Cytoskelettstruktur nach Sorbitol-Behandlung	60
5.2.	Durch osmotischen Stress induzierte Apoptose	63
5.2.1.	Aktivierung von Caspase-3 nach Sorbitol-Behandlung	63
5.2.2.	Verschiedene Apoptose Stadien in HaCaT/pMSG und E5 Zellen mit aktivierter Caspase-3	65
5.2.3.	Osmotischer Schock durch Sorbitol-Behandlung führt zur Aktivierung der intrinsischen Apoptose	66
5.2.4.	Durch Sorbitol-Behandlung aktivierte Stresskinase p38 wird in HaCaT/E5 Zellen nur langsam dephosphoryliert	67
5.2.5.	Inhibierung von p38 durch SB 203580 verhindert die Sorbitol-induzierte Cytochrom c-Freisetzung	68
5.2.6.	Inhibierung von p38 durch SB 203580 reduziert nicht die Sorbitol-induzierte Procaspase-3 Spaltung	69
5.2.7.	Osmotischer Schock durch Sorbitol-Behandlung führt zur Aktivierung der extrinsischen Apoptose	70
5.2.8.	Die Sorbitol-induzierte Aktivierung des EGFR beeinflusst nicht die Apoptose	71
5.2.9.	HPV-16 E5 sensitiviert HaCaT Zellen für Apoptose auch bei niedrigeren Temperaturen	72
5.2.10.	Die Wirkung von E5 auf die Apoptose ist nicht nur auf HaCaT Zellen begrenzt	74
5.3.	Durch die Liganden TRAIL und FasL induzierte Apoptose	76
5.3.1.	Die Aktivierung von Caspase-3 nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in <i>Raft</i> -Kulturen von HaCaT/E5 Zellen ist stark reduziert	76
5.3.2.	Die Aktivierung von Caspase-3 nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in Monolayer Kulturen von HaCaT/E5 Zellen ist stark reduziert	77
5.3.3.	Die Spaltung von Procaspase-8, -3 und PARP nach TRAIL-Behandlung ist in HaCaT/E5 Zellen nicht nachweisbar	79
5.3.4.	Die Spaltung von Procaspase-8 und PARP nach FasL-Behandlung ist in HaCaT/E5 Zellen deutlich reduziert	81
5.3.5.	Die Expression des Caspase-8 Inhibitors c-FLIP wird nicht durch E5 beeinflusst	81
5.3.6.	Die Oberflächenexpression von Fas, aber nicht von DR4 und DR5, ist in HaCaT/E5 Zellen reduziert	82
5.3.7.	Die TRAIL-induzierte DISC Formation ist in HaCaT/E5 Zellen verhindert	84
5.3.8.	Die Gesamtexpression an Fas Rezeptoren ist in HaCaT/E5 Zellen stark reduziert	85
5.3.9.	Die Menge an GTP-Ras ist höher in HaCaT/E5 Zellen als in HaCaT/pMSG	86
5.3.10.	Der anti-apoptotische Effekt in HaCaT/E5 Zellen hängt von der E5 Expression ab	87
5.3.11.	Die reduzierte Fas Oberflächenexpression in HaCaT/E5 Zellen ist nicht der einzige Grund für den Schutz vor FasL-vermittelter Apoptose	89

5.3.12.	Die E5-exprimierenden Mausfibroblasten A31-E5 sind vor TRAIL- nicht aber vor FasL-vermittelter Apoptose geschützt	90
6.	DISKUSSION	92
6.1.	Aktivierung der Signaltransduktion durch osmotischen Stress	92
6.2.	Durch osmotischen Stress induzierte Apoptose	96
6.3.	Durch die Liganden TRAIL und FasL induzierte Apoptose	99
7.	ZUSAMMENFASSUNG	105
8.	REFERENZEN	107
9.	ANHANG	116
9.1.	Abbildungsverzeichnis	116
9.2.	Tabellarischer Lebenslauf	117
9.3.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	118
9.4.	Danksagung	118
9.5.	Ehrenwörtliche Erklärung	119

1. EINLEITUNG

1.1. Taxonomie

Das humane Papillomvirus Typ 16 (HPV-16) wird gemäß der Klassifikation des „Internationalen Komitees für Taxonomie der Viren“ (ICTV; Melnick et al., 1974) der Familie der *Papovaviridae* zugeordnet, welche aus den Subfamilien der Papilloma-, Polyoma- und vakuolisierenden Viren besteht. Bisher wurden ca. 90 verschiedene humanpathogene Vertreter der Papillomviren charakterisiert, annähernd 50 weitere Typen sind über Teilsequenzen identifiziert. Ein neuer Papillomvirus-Typ wird definiert, wenn bei einem Vergleich der Nukleotidsequenz des konservierten L1-Gens mit der analogen Sequenz aller bekannten Papillomvirus-Typen die Homologie dieses Abschnitts unter 90% liegt. Ist die Homologie über 90%, liegt ein Subtyp zum nächstverwandten Papillomvirus-Typ vor.

Die humanen Papillomviren sind streng Spezies- und Gewebe-spezifisch und lassen sich in sogenannte ›Haut‹- und ›Schleimhaut‹-Typen einteilen (McMurray et al., 2001). Der größte Anteil der Haut-Typen zählt zu einer Untergruppe von Papillomviren, die aus Läsionen von Patienten mit *Epidermodysplasia verruciformis* isoliert wurden, wobei HPV-5 und HPV-8 die bekanntesten Typen darstellen. Mehr als 40 Typen gehören zur Gruppe der Schleimhaut-assoziierten Viren, darunter sind die bekanntesten Vertreter HPV-16 und -18. Da in der vorliegenden Arbeit die Funktion des HPV-16 E5 Proteins untersucht wurde, werden im Folgenden nur die Eigenschaften dieses speziellen Virus genauer beschrieben.

1.2. Medizinische Aspekte

Papillomviren infizieren proliferierende epitheliale Basalzellen von Haut und Schleimhaut und verursachen häufig meist gutartige Tumore in verschiedenen Erscheinungsformen bei Mensch und Tier. Beschreibungen solcher "Papillomata" finden sich schon in der griechischen Literatur der Antike.

Seit den 70er Jahren nehmen anogenitale HPV Infektionen weltweit dramatisch zu, vor allem bei Jugendlichen zwischen 15 und 25 Jahren. Sie gelten heute als die häufigsten, sexuell übertragenen Viruskrankheiten. 1995 schätzten die „Centers for Disease Control“ (CDC), Atlanta, die Neuinfektionen in den USA

auf 0,5-1,0 Million pro Jahr. In der Gruppe der Schleimhaut-assoziierten Papillomviren werden die HPV-Typen zusätzlich in „low risk“ und „high risk“ Gruppen unterteilt. Zu den letzteren gehören HPV-16 und -18, deren DNA in 70-80% aller Zervixkarzinome nachweisbar ist (Zur Hausen, 1991). HPV-16 DNA ist mit ca. 50-60% weltweit der häufigste HPV-Typ in zervikalen Karzinomen, gefolgt von HPV-18 in 10-20% der Fälle. Das Zervixkarzinom ist nach dem Mammakarzinom der zweithäufigste maligne Tumor der Frau. HPV Infekte werden größtenteils durch Elimination des Virus spontan überwunden, persistieren aber doch in 20% der Fälle (Hildesheim et al., 1994). Die Elimination der HP Viren mit entsprechender Regression der Läsionen ist altersabhängig. Persistierende Infekte sind bei Frauen über 30 Jahren häufiger als bei jüngeren. Die Persistenz hochriskanter HPV-Typen ist Voraussetzung für die Progression der Läsion in Richtung Malignität. Dabei unterscheidet man den Schweregrad der Erkrankung in sogenannte „Cervical Intraepithelial Neoplasia“ (CIN) in Typen I-III. Bei Karzinomen ist die HPV DNA ins Genom der Wirtszelle integriert, in präkanzerösen Läsionen liegt sie extrachromosomal im Zellkern vor (McMurray et al., 2001). Transiente Infektionen immunkompetenter Menschen führen meist zu einer milden Erkrankung, die sich spontan zurückbilden kann. Dagegen wurden bei Patienten mit Immundefekten (lymphoproliferative Erkrankung, Organtransplantation, HIV Infektion etc.) HPV Erkrankungen mit z.T. schweren Verläufen beobachtet. Als therapeutisches Mittel steht bei den malignen Formen der Erkrankung im Genitalbereich nur die operative Entfernung zur Verfügung. Eine wirksame Immunprophylaxe existiert bisher noch nicht, prophylaktische und therapeutische Vakzinen sind aber bereits in der klinischen Testphase (z.B. MediGene AG, 2001, Phase 1/2).

1.3. Biologische Aspekte

1.3.1. Virionstruktur und Genomaufbau

Die Papillomviren sind kleine ikosaedrische Capside ohne Membranhülle mit einem Durchmesser von 55 nm, die sich aus 72 Capsomeren zusammensetzen (Abb. 1.1). Diese werden zu 80% von L1 und zu 20% von L2 gebildet.

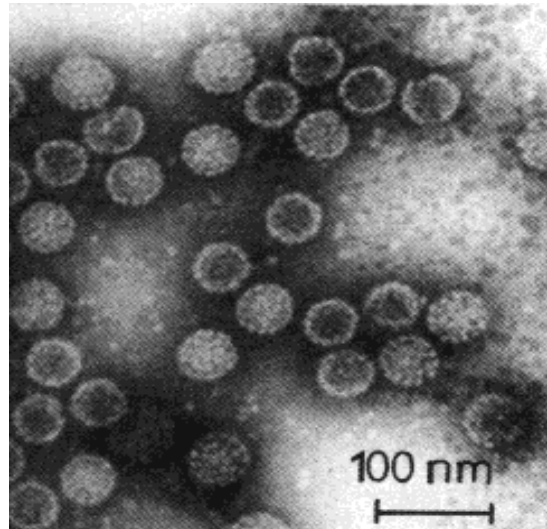


Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Papillomviren mit der charakteristischen Ikosaeder-Struktur.

Quelle: H. Gelderblom, RKI

Im Inneren der Capside befindet sich das virale doppelsträngige DNA-Genom, welches ca. 8000 bp groß ist und als kovalent geschlossener Ring mit zellulären Histonen in einer Nucleosomen-ähnlichen Struktur vorliegt. Das Genom beinhaltet verschiedene offene Leserahmen („Open ReadinG Frames“, ORF), die nur auf einem der DNA-Stränge codiert sind und Genen entsprechen, deren Produkte in sogenannte frühe („Early“) oder späte („Late“) Proteine eingeteilt werden können. Eine nichtcodierende Region, die LCR („Long Control Region“) oder URR („Upstream Regulatory Region“) genannt wird, liegt zwischen den späten und den frühen Genen im Virusgenom. Dieser DNA-Abschnitt besitzt eine Reihe von Bindungsstellen sowohl für verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren als auch für virale Proteine, z.B. für die viralen E2 und E1 Proteine, die durch ihre Bindung die Expression und Replikation des Virusgenoms regulieren. Der P₉₇ Promotor befindet sich direkt vor dem E6 ORF und gilt als der Hauptpromotor von HPV-16, wobei aber noch weitere zusätzliche Promotoren existieren (z.B. im E7 ORF) (Braunstein et al., 1999). In Abbildung 1.2 ist schematisch das zirkuläre virale Genom von HPV-16 linear dargestellt. Es gibt drei verschiedene Leseraster, die durch komplexe Spleißereignisse eine Vielzahl von mono- und polycistronischen mRNAs erlauben. In CIN-I Läsionen konnte gezeigt werden, dass die mRNAs für E4 und E5 ORFs am häufigsten vorkommen (Stoler et al., 1992). E5 wird dabei zusammen mit dem E2 ORF exprimiert, was darauf schließen lässt, dass das

HPV-16 E5 Protein seine Funktion in einer frühen Phase der Infektion entfaltet (Koefoed Johnsen et al., 1995).

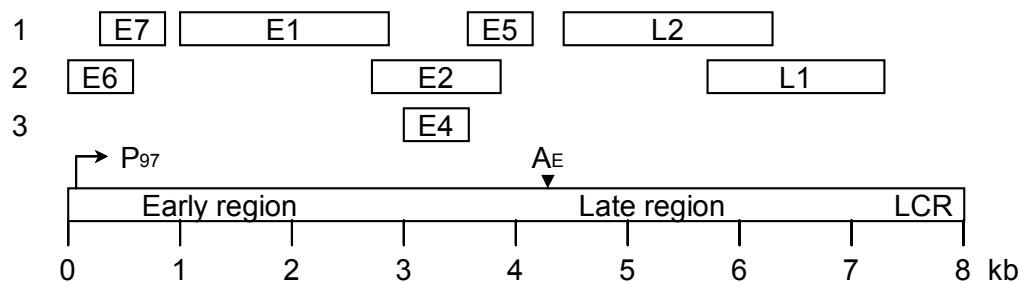


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des linearisierten Genoms von HPV-16. Die Zeilen 1, 2 und 3 kennzeichnen die verschiedenen Leseraster; die Boxen entsprechen den relativen Positionen der codierenden Abschnitte für die einzelnen Genprodukte. Früher Promotor: P₉₇; frühes Polyadenylierungssignal: A_E 4214

1.3.2. Infektionszyklus

Das humane Papillomvirus dringt über Mikroläsionen der Haut ein und infiziert basale Epithelzellen. Die Adsorption der Viruspartikel an die Wirtszellmembran findet vermutlich hauptsächlich über die Integrine $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ statt (Yoon et al., 2001), wobei zusätzlich Heparansulfat auf der Zelloberfläche vorhanden sein muss (Giroglou et al., 2001). In der infizierten Zelle wird eine Kopienzahl von 50-100 viralen Genomen eingerichtet, die nach der Teilung in den beiden Tochterzellen erhalten bleibt (McMurray et al., 2001). Während eine der beiden Zellen in der Basalzellschicht verbleibt, wandert die andere in suprabasale Schichten ein und beginnt sich zu differenzieren (Abb. 1.3). Diese Tatsache stellt für das Virus ein Problem dar, da die Replikationsmaschinerie der Zelle für die virale DNA Synthese benötigt wird und terminal differenzierte Zellen nur wenig oder keine Replikationsenzyme enthalten. Daher muss das Virus die Progression von der G1- zur S-Phase trotz Differenzierung stimulieren. Ein gewisser Grad an Differenzierung wird jedoch benötigt, damit der späte Promotor aktiviert werden kann und die Strukturproteine gebildet werden können. Das Endergebnis ist daher, dass das Virus vermutlich durch das E7 Protein, die Zellzyklus Progression von der G1- zur S-Phase von der Differenzierung entkoppelt, so dass in der gleichen Zelle beide Prozesse parallel ablaufen können. Die virale DNA wird im Stratum granulosum zu einer hohen Kopienzahl amplifiziert und die Partikelzusammensetzung findet im Stratum corneum statt (siehe schwarze Punkte in Abb. 1.3). Über das

Abschilfern der infizierten Hornschuppen vervollständigt sich der virale Lebenszyklus (Meyers et al., 1997; Mayer und Meyers, 1998).

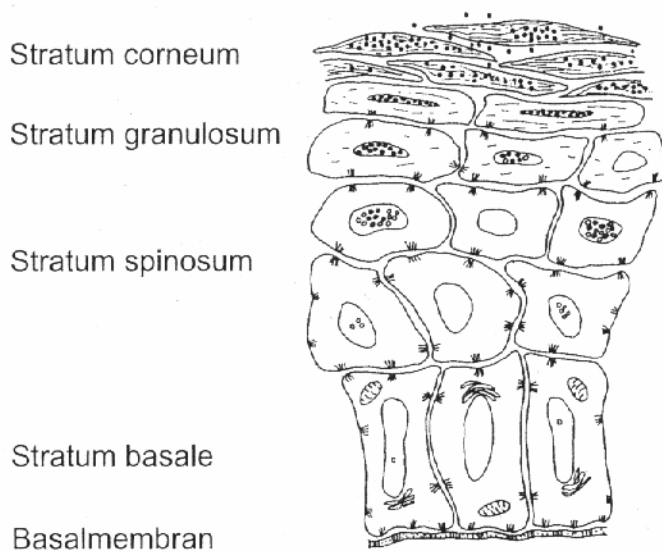


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Hautschichten und Virusvermehrung. Die schwarzen Punkte kennzeichnen Viruspartikel. Erläuterungen im Text. Quelle: „Molekulare Virologie“ von Modrow/Falke (modifiziert).

Da sich das Virus nur in den äußersten Hautschichten stark vermehrt, kann es viele Jahre lang vom Immunsystem unentdeckt bleiben. Über eine so große Zeitspanne steigt das Risiko, dass in den infizierten Zellen genetische Mutationen auftreten können, die dann zur Tumorentstehung führen. Eine Eliminierung der Infektion wird durch die Apoptose der infizierten Zellen erreicht. Dies kann durch das Immunsystem eingeleitet werden, indem es zu einer spontanen Einwanderung von cytotoxischen T-Zellen kommt, die auf MHC-I Molekülen präsentierte virale Peptide erkennen und die infizierte Zelle abtöten. Es wurde außerdem beschrieben, dass sogenannte „Virus-like Particles“ (VLPs) über den FcγRIII (=CD16) an die Langerhans-Zellen der Epidermis binden können (Da Silva et al., 2001). Eine zweite Möglichkeit stellt die autonome Einleitung der Apoptose dar, bei der die infizierte Zelle sich selbst über einen p53-vermittelten Weg abtötet. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass das HPV-16 E6 Protein die infizierte Zelle vor TNF α -induzierter Apoptose schützen kann (Filippova et al., 2002) und das Virus so möglicherweise trotz Entdeckung durch das Immunsystem überleben kann.

Die experimentelle Viruszüchtung ist aufgrund der fehlenden Differenzierung in Monolayer Zellkulturen nicht möglich. Durch eine spezielle Zellkulturtechnik kann eine hautähnliche Organisation und Differenzierung von humanen Keratinocyten wie den HaCaT Zellen erreicht werden (Schoop et al., 1999), die als sogenannte „organotypic coculture“ oder *Raft*-Kultur bezeichnet wird (siehe 4.2.1.4.). In einem solchen System ist bisher nur die Produktion einiger weniger Papillomviren gelungen (Meyers et al., 1997; Mayer und Meyers, 1998), so dass für die Erforschung nur einzelne virale Proteine eines bestimmten HPV-Typs verwendet werden.

1.3.3. Funktion der viralen Proteine

Die virale DNA von HPV-16 codiert für sechs frühe (E1, E2, E4, E5, E6 und E7) und zwei späte (L1 und L2) Proteine. Ein kurzer Steckbrief für die verschiedenen viralen Proteine ist in Tabelle 1.1 aufgeführt (siehe unten). Die Wechselwirkung zwischen zellulären und viralen Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Aktivität des viralen Genoms ist sehr komplex. Die frühen Proteine regulieren die Replikation des Genoms, seine Persistenz in der Zelle und die virale Genexpression unter vorgegebenen Bedingungen. Dabei stellt das E2 Protein einen wesentlichen intragenomischen Regulator dar, indem es entweder die Einschaltung oder Abschaltung anderer Gene, z.B. der E6- und E7-Gene, die für die maligne Transformation einer Zelle verantwortlich sind, kontrolliert. Die Bindung des E1 Proteins im Bereich der LCR ist für die Replikation der viralen DNA notwendig. Während E1 und E2 also für die Replikation des viralen Genoms essentiell sind (Frattini und Laimins, 1994), sind die E6 und E7 Proteine verantwortlich für die Aufrechterhaltung der korrekten Umgebung für die DNA Replikation in der Wirtszelle, indem sie einem möglichen Zellzyklus-Arrest entgegenwirken und die intrinsische, p53-abhängige Apoptose verhindern (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990; McMurray et al., 2001). Dabei bindet das E7 Protein unter anderem an hypophosphoryliertes RB105/107 und führt damit zur Freisetzung des Transaktivators E2F, wodurch die Zelle vorzeitig von der G1- zur S-Phase übergeht (Dyson et al., 1989; Huang et al., 1993). Dadurch wird die Repression von bestimmten Genen aufgehoben, die in die Differenzierung und Proliferation der Zelle involviert sind, und somit möglicherweise der Differenzierungsprozess

vom Fortschreiten des Zellzyklus entkoppelt. Für das Virus würde eine ideale Umgebung geschaffen werden, die eine teilweise Differenzierung und gleichzeitig Replikation erlaubt. Das E6 Protein kann die intrinsische Apoptose durch Degradation von p53 blockieren und die Aktivität der zellulären Telomerase erhöhen, wodurch die Lebenszeit der Zelle verlängert wird (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990; McMurray et al., 2001). Die genaue Funktion des E4 Proteins ist noch nicht geklärt, möglicherweise hilft es bei der Freisetzung von Viruspartikeln. Dieses Protein wird erst zu einem späten Zeitpunkt in der Infektion zusammen mit den Strukturproteinen L1 und L2 gebildet und kommt in höherer Konzentration in den differenzierenden Zellschichten vor. Es ist in der Lage, mit den Cytokeratin-Intermediärfilamenten zu interagieren und einen Kollaps der Cytokeratin Matrix herbeizuführen, wobei das Tubulin- und Actin-Netzwerk wie auch die nukleären Lamine nicht beeinträchtigt werden (Doorbar et al., 1991; Roberts et al., 1994).

Das E5 Protein, welches Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen ist, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

Protein	Lokalisation	Funktion
E1 ca. 68-85 kD	Zellkern	Initiation der viralen Replikation
E2 ca. 48 kD	Zellkern	Transaktivator/Transrepressor
E4 ca. 10-34 kD	hauptsächlich Cytoplasma	bindet und zerstört die Cytokeratin-Strukturen
E5 ca. 10 kD	Membranen	beeinflusst die Signaltransduktion
E6 ca. 16 kD	Cytoplasma	inhibiert p53-vermittelte Apoptose
E7 ca. 10 kD	Zellkern	bindet pRB und führt zur Zellzyklus Progression
L1 ca. 57 kD	Cytoplasma/Zellkern	Hauptcapsidprotein
L2 ca. 43-53 kD	Cytoplasma/Zellkern	Nebencapsidprotein

Tab. 1.1: Funktion der viralen Proteine von HPV-16.

1.3.3.1. Das HPV-16 E5 Protein

Anders als die anderen viralen Proteine ist E5 ein kleines, stark hydrophobes Membranprotein von 83 Aminosäuren, das mit den Membranen des Golgi Apparates, des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Kerns assoziiert ist (Conrad et al., 1993). Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Epitop-tragenden Fusionsproteins für E5 durchgeführt, da es aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften von E5 keine zuverlässigen Antikörper gibt, um

dieses virale Protein nachzuweisen. Eine hypothetische Struktur konnte mit Hilfe des Kyte-Doolittle Hydrophobizitäts-Algorithmus vorausgesagt werden (Ullman et al., 1994). Demnach enthält E5 drei α -helikale Membrandomänen, die durch kurze hydrophile Abschnitte voneinander getrennt werden; kurze Regionen an den C- und N-terminalen Enden ragen möglicherweise aus der Membran heraus. Durch die Sequenzanalyse konnten mögliche funktionelle Regionen des E5 Proteins definiert werden, die mit bisher bekannten tatsächlichen Funktionen von E5 vereinbar sind.

Die Expression von E5 in der Mausfibroblasten Zelllinie A31 führt zu einer erhöhten Aktivierung der Phospholipase C- γ -1 und einer veränderten Zusammensetzung der Membranphospholipide (Crusius et al., 1999). Ebenfalls in einer Mausfibroblasten Zelllinie (C127) konnte gezeigt werden, dass E5 das Actin-Cytoskelett umstrukturieren kann und damit den Transport von endocytisierten Vesikeln inhibiert (Thomsen et al., 2000).

E5 beeinflusst die Signaltransduktionswege, was zu einem komplexen Muster an beobachteten Effekten führt. Der wohl am besten untersuchte Signaltransduktionsweg ist die über den „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR)-vermittelte Kaskade. In humanen Keratinocyten führt die Expression von E5 zu einer Verstärkung der EGFR Kaskade (Crusius et al., 1998, 2000; Pim et al., 1992; Straight et al., 1993), was eine gesteigerte Aktivität des c-Jun Gens über den Ras-abhängigen Signalweg zur Folge hat (Chen et al., 1996; Bouvard et al., 1994). Man vermutet, dass es zu einer stärkeren EGFR Aktivierung kommt, da HPV-16 E5 an die 16 kD Untereinheit der vakuolaren Proton-ATPase binden kann und so die Ansäuerung der Endosomen verhindert, wodurch es zu einem vermehrten Rezeptor Recycling kommt (Straight et al., 1993; Auvinen et al., 1997; Faulkner-Valle und Banks, 1995). Die Bindung an die H⁺-ATPase allein konnte aber nicht die Überaktivierung der EGFR erklären (Adam et al., 2000; Rodriguez et al., 2000) und manche Autoren konnten nie einen durch E5 vermittelten Verlust der Azidifizierung der Endosomen feststellen (Thomsen et al., 2000). Was die genaue Ursache für die stärkere Aktivierung des EGFR ist, konnte bis jetzt nicht entschlüsselt werden. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz in den Ergebnissen von verschiedenen Arbeitsgruppen könnte sein, dass aufgrund der schwachen Immunogenität mit verschiedenen Epitop-tragenden E5 Proteinen gearbeitet wird (z.B. FLAG, HA, RNGS, AU, GFP,...).

Außerdem lassen sich die eigentlichen Zielzellen des Virus, nämlich humane Keratinocyten nur sehr schlecht transfizieren, so dass für die Interaktionsanalysen meist Zellen verschiedener Spezies und Typen verwendet werden (z.B. Mausfibroblasten oder Affennierenepithelzellen), was ebenfalls zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen könnte.

Die genaue Funktion von E5 im viralen Lebenszyklus ist unbekannt und viele der oben beschriebenen Effekte mögen auf die Lokalisation des hydrophoben Moleküls in den Zellmembranen zurückzuführen sein. Wie durch Untersuchungen an Nagerzellen gezeigt werden konnte, besitzt das E5 Protein neben den Hauptonkoproteinen E6 und E7 nur schwache onkogene Eigenschaften (Leechanachai et al., 1992; Leptak et al., 1991; Pim et al., 1992; Faulkner-Valle und Banks, 1995). E5 erlaubt das ankerlose Wachstum von humanen Keratinocyten Kolonien in Soft Agarose (Chen et al., 1996), induziert die Immortalisierung von humanen Keratinocyten (Conrad-Stöppler et al., 1996) und reduziert die Gap-Junction-vermittelte Zell-Zell Kommunikation (Oelze et al., 1995). Die Expression von HPV-16 E5 in CIN Läsionen korreliert mit einer verstärkten Expression des EGFR (Chang et al., 2001), wobei dies mit einem Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell Kommunikation assoziiert werden kann (Wilding et al., 1996). Große Mengen an E5 mRNA wurden in abnormalen Zervixabstrichen (Biswas et al., 1997) und CIN-I Läsionen gefunden, was darauf schließen lässt, dass E5 eine Rolle während der frühen Zelltransformation spielt (Kell et al., 1994; Stoler et al., 1992).

Die Integration der HPV-16 DNA in das Genom der Wirtszelle stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von sogenannten „low grade“ bzw. „high grade squamous intraepithelial lesions“ (LGSIL bzw. HGSIL) zu „invasive cervical carcinoma“ (ICC) dar (Ferenczy und Franco, 2002). Dabei muss das zirkuläre virale Genom geöffnet werden, was vorwiegend in der Region des E2 Gens geschieht, wodurch die Repression des P₉₇ Promotors durch E2 aufgehoben wird (Tonon et al., 2001). Dies führt zu einer stärkeren Expression an E6 und E7 Proteinen, die möglicherweise auf einer erhöhten Stabilität der E6 und E7 mRNAs beruht (Jeon und Lambert, 1995). Die vermehrte Bildung dieser viralen Proteine trägt dann zur Malignisierung der Zelle bei. Bei der Integration von HPV-18 DNA wird nicht nur der E2 ORF zerstört, sondern auch der von E4, E5, L2 und teilweise von L1 (Corden et al., 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit

zwischen HPV-16 und –18 kann man somit vermuten, dass HPV-16 E5 nicht für die Entstehung und Erhaltung von Tumoren notwendig ist.

1.4. Signaltransduktion

Die Signaltransduktionswege der „Mitogen-activated Protein Kinases“ (MAPK) gehören zu den am meisten verbreiteten Mechanismen der eukaryontischen Zellregulation (Kyriakis und Avruch, 2001; Cano und Mahadevan, 1995). Sie können durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden, z.B. durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Entzündungscytokine wie $\text{TNF}\alpha$ oder IL-1, aber auch durch Umgebungsstress wie osmotischen Schock, Hitze/Kälte, ionisierende Strahlung und Ischämie. Die MAPK Wege wiederum koordinieren die Aktivierung von Gentranskription, Proteinsynthese, Zellzyklusmaschinerie, Zelltod und Differenzierung, wodurch sie eine tiefgreifende Wirkung auf die Zellphysiologie ausüben. In der Zelle existieren verschiedene MAPK Wege parallel nebeneinander, die in einem komplizierten Netzwerk miteinander interagieren können und genau reguliert werden. Im Prinzip sind alle Wege aus drei Bausteinen aufgebaut:

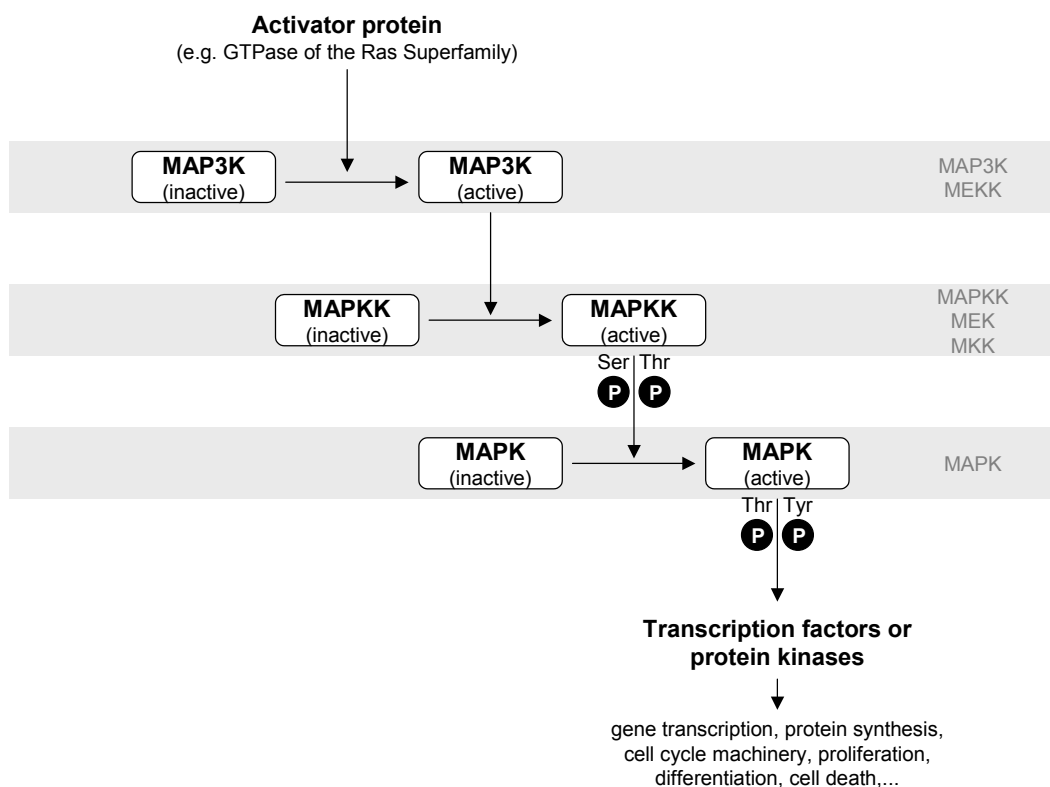


Abb. 1.4: Schematisches 3er Modul der MAPK Wege. Erläuterungen siehe Text. Quelle: Kyriakis und Avruch, 2001 (modifiziert).

Die MAPK Kinasen Kinasen (MAPKKK=MAP3K=MEKK) werden durch die Bindung eines Aktivatorproteins (z.B. GTPase der Ras Superfamilie) an die Membran rekrutiert, wo es zu einer Aktivierung durch Oligomerisierung und Phosphorylierung kommt. Die aktivierten dual-spezifischen MAP3K phosphorylieren nun ihrerseits die dual-spezifischen MAPK Kinasen (MAPKK=MKK=MEK) an Serin und Threonin, wodurch diese ebenfalls aktiviert werden. Anschließend phosphorylieren die aktivierten MAPKK die MAP Kinasen (MAPK) in der Kinase Subdomäne VIII an Threonin und Tyrosin in einem spezifischen Thr-X-Tyr Motiv. In Folge phosphorylieren die Prolin-gerichteten MAPK verschiedene physiologische Substrate an Threonin wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder andere Proteinkinasen. In Abbildung 1.4 ist schematisch das vereinfachte 3er Modul der MAPK Wege gezeigt. Die genaue Organisation der Wege wird über verschiedene sogenannte „Scaffold“ Proteine vermittelt, welche die Effizienz und Selektivität gewährleisten. Da in der vorliegenden Arbeit die Signaltransduktion über osmotischen Stress aktiviert wurde, sollen im Folgenden diese Wege näher beschrieben werden.

1.4.1. Aktivierung der MAP Kinasen durch osmotischen Stress

In diesem Kapitel werden zwei Gruppen von MAP Kinasen beschrieben: Die „Stress-activated Protein Kinases/c-Jun N-terminal Kinases“ (SAPK/JNK), bei denen man mindestens 12 verschiedene Typen unterscheidet und die p38 Kinasen, von denen 4 Isoformen existieren (α , β , γ , δ). In Abbildung 1.5 ist schematisch die vereinfachte Aktivierungskaskade gezeigt, die zu der Phosphorylierung der MAP Kinasen JNK (TPY Motiv) bzw. p38 (TGY Motiv) führt (Paul et al., 1997; Ono und Han, 2000; Kyriakis und Avruch, 2001).

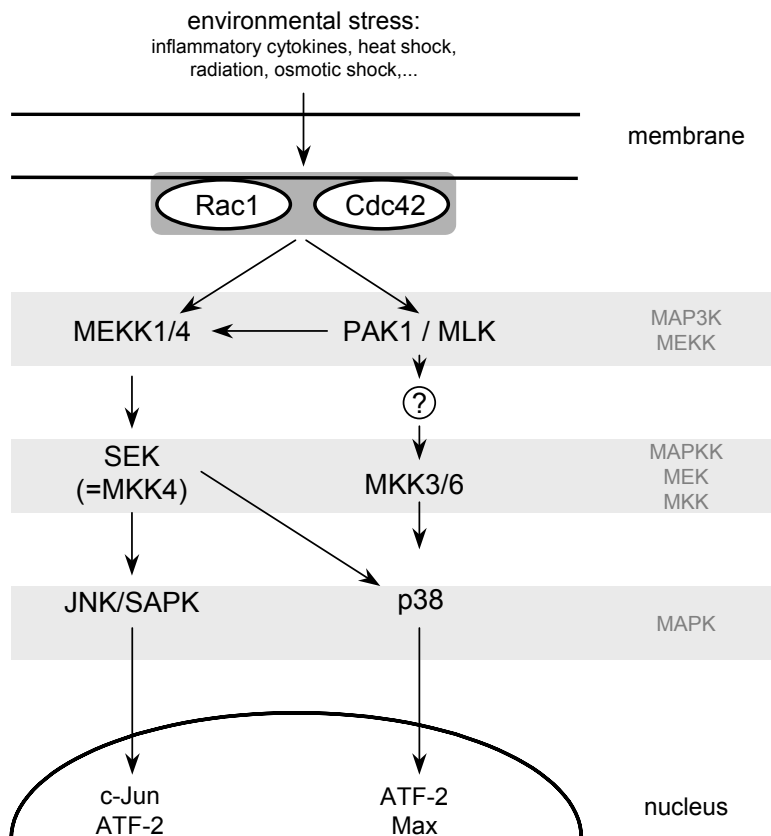


Abb. 1.5: Schematische Aktivierung der Stresskinasen JNK und p38. Erläuterungen siehe Text.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass alle Signaltransduktionswege stark vom Zelltyp abhängig sind, so dass manche Kreuzaktivierungen nicht in allen Zellen vorkommen. Durch die Aktivierung der kleinen G-Proteine Rac1 und Cdc42, die zur Rho p21 Familie der Ras Superfamilie gehören (Ras Superfamilie: Ras, Rho, Arf, Sar, Ran, Rab) kommt es zur Bindung an Effektorkinasen mit einem „Cdc42/Rac Interactive Binding“ (CRIB) Motiv (Burbelo et al., 1995) wie z.B. der „p21-activated Kinase“ (PAK) oder der „Mixed-Lineage Kinase“ (MLK), die daraufhin durch Autophosphorylierung aktiviert werden (Benard et al., 1999) und somit andere Substrate (MKKs) an Serin und Threonin phosphorylieren können. Diese wiederum aktivieren die MAP Kinasen JNK und p38, die verschiedene Substrate, z.B. Transkriptionsfaktoren oder andere Proteinkinasen, aktivieren. Dies bewirkt eine Reihe von verschiedenen Zellantworten wie z.B. eine Neustrukturierung des Actin-Cytoskeletts und den programmierten Zelltod.

1.4.2. Apoptose

Die normale Zell- und Gewebe-Homöostase spiegelt ein Gleichgewicht von Proliferation, Differenzierung und Zelltod wider. Die Apoptose ist ein Prozess zur spezifischen Eliminierung von Zellen, ohne umliegendes Gewebe zu schädigen, und ist daher für die normale Entwicklung und Funktion eines mehrzelligen Organismus essentiell. Fehlfunktionen in der Kontrolle des programmierten Zelltodes führen zu einer Vielzahl verschiedener Krankheiten, einschließlich Krebs (Thompson, 1995; Strasser et al., 2000). Man unterscheidet zwei Hauptwege der Apoptose (Budihardjo et al., 1999; Fesik, 2000; Hengartner, 2000), die in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt sind:

1. Im extrinsischen Todesrezeptorweg (links im Bild) werden die Rezeptoren durch spezifische Liganden aktiviert, wie z.B. durch den „Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand“ (TRAIL) oder „Fas Ligand“ (FasL=CD95L). FasL bindet an den Fas Rezeptor (Fas=CD95=Apo-1), was zur Trimerisierung der Rezeptoren führt (Schneider et al., 1997a, b; Walczak und Krammer, 2000). TRAIL interagiert mit vier zellgebundenen und einem sezernierten, löslichen Rezeptor, der Osteoprotegerin (OPG) genannt wird (Emery et al., 1998). Von den vier zellulären Rezeptoren tragen nur die TRAIL Rezeptoren 1 (DR4=TRAIL-R1) und 2 (DR5=TRAIL-R2) eine intrazelluläre „Death Domain“ (DD) und können so das apoptotische Signal weiterleiten (Kischkel et al., 2000; Pan et al., 1997a, b; Schneider et al., 1997b; Sheridan et al., 1997; Sprick et al., 2000). Im Gegensatz dazu können die TRAIL Rezeptoren 3 (TRAIL-R3=DcR1) und 4 (TRAIL-R4=DcR2) keine Apoptose vermitteln, da ihnen vollständig bzw. teilweise die cytoplasmatische DD fehlt (Pan et al., 1997b; Pan et al., 1998; Sheridan et al., 1997). Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor bilden sich homo- und heterotrimere Strukturen aus (Schneider et al., 1997; Hymowitz et al., 1999). Die Trimerisierung der aktivierten Fas und TRAIL Rezeptoren führt zur Bindung des Adaptorproteins FADD („Fas-associated Death Domain Protein“) über dessen DD und anschließend zur Rekrutierung von Procaspase-8 (Walczak und Krammer, 2000). Dieser Proteinkomplex wird „Death-inducing Signaling Complex“ (DISC) genannt. Die DISC Formation stellt nun die notwendige

Umgebung zur Verfügung, damit Procaspase-8 durch autokatalytische Spaltung aktiviert werden kann (Scaffidi et al., 1999; Krueger et al., 2001).

Bei den Caspasen (Cystein-Aspartasen) handelt es sich um Proteasen, die im aktiven Zentrum ein Cystein besitzen und ihre Substrate nach Aspartatresten schneiden. In gesunden Zellen liegen diese Enzyme in einer inaktiven Pro-Form vor und müssen erst gezielt durch Spaltung aktiviert werden. Die Initiator Caspase-8 wird im DISC durch die induzierte räumliche Nähe zu anderen Procaspase-8 Molekülen autokatalytisch gespalten, wodurch die proteolytisch aktive Untereinheit freigesetzt wird. Die Aktivierung dieser Initiator Caspase führt wiederum zur Aktivierung von Effektor Caspasen wie Caspase-3, die dann das apoptotische Programm durchführen. Eines der Substrate von Caspase-3 ist das DNA Reparaturenzym Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP), welches durch die Spaltung inaktiviert wird. Die Signalkette der Apoptose kann durch c-FLIP unterbrochen werden, welches eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Caspase-8 aufweist und an FADD mit einer höheren Affinität als Caspase-8 bindet (Scaffidi et al., 1999; Krueger et al., 2001). Die Bindung von c-FLIP verhindert so die weitere Rekrutierung von Caspase-8 in den Komplex. In der Folge kommt es zur Spaltung von c-FLIP, die zu einer Freisetzung einer Caspase-ähnlichen, aber proteolytisch inaktiven Untereinheit führt.

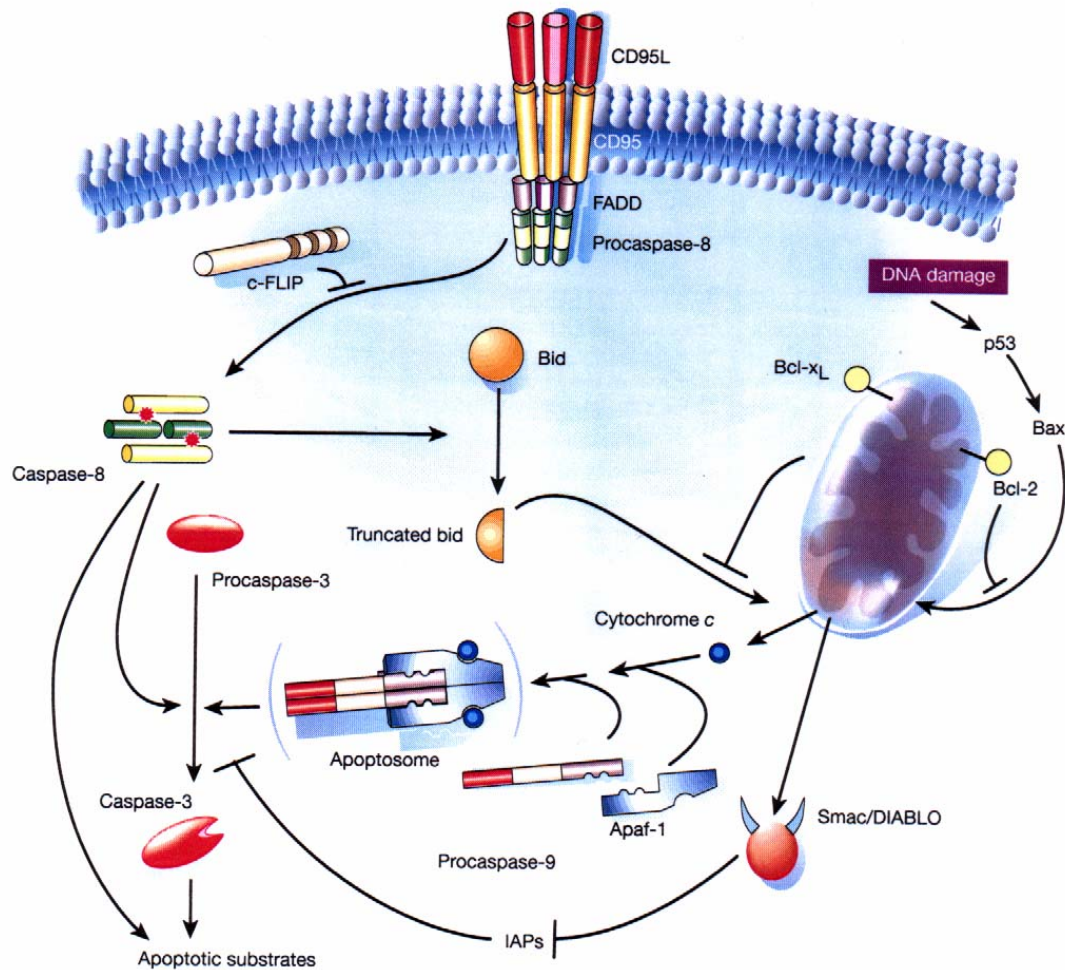


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Hauptwege der Apoptose in Säugerzellen. Die Stöchiometrie des Apoptosoms ist unbekannt. Erläuterungen im Text. Quelle: Hengartner, 2000 (modifiziert).

2. Der intrinsische mitochondriale Weg (rechts im Bild) wird als Antwort auf eine Reihe von eher unspezifischen Stimuli wie DNA-Schäden, ionisierende Strahlung und osmotischen Stress (Rich et al., 2000) genutzt, wodurch es zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien kommt. Dies geschieht durch die Aktivierung von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie z.B. Bax und Bid, die durch verschiedene Mechanismen wie Proteolyse oder Dephosphorylierung aktiviert werden können. Überwiegt der Anteil an aktivierten pro-apoptotischen Proteinen gegenüber den anti-apoptotischen Mitgliedern (z.B. Bcl-2 oder Bcl-X_L), so kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c, möglicherweise durch die Bildung von Poren bzw. Kanälen oder durch Reißen der Mitochondrienmembran aufgrund einer veränderten Ionenkonzentration, wodurch die Zellorganelle anschwillt und schließlich platzt. Cytoplasmatisches Cytochrom c

bildet dann zusammen mit Apaf-1 („Aptotic Protease Activating Factor-1“), ATP und Procaspase-9 einen Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird und zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Diese kann nun die zentrale Procaspase-3 spalten und dadurch aktivieren. Hier treffen sich die beiden Apoptosewege und man geht davon aus, dass ab diesem Punkt das Apoptoseprogramm nicht mehr abgebrochen werden kann.

Die kontrollierte Regulation der Apoptose erfolgt durch sogenannte „Inhibitors of Aptosis Proteins“ (IAPs), die einer zufälligen spontanen Aktivierung der Caspasen entgegenwirken. Diese werden wiederum ihrerseits durch den IAP Inhibitor Smac/DIABLO gehemmt („Second Mitochondria-derived Activator of Caspases“/„Direct IAP-binding Protein with low pI“).

Bis heute konnten noch nicht alle Apoptose-Regulationsmechanismen geklärt werden und Studien an „Knockout“ Mäusen lassen vermuten, dass es möglicherweise neben den beiden hier gezeigten Wegen auch alternative Signalketten gibt, die zum programmierten Zelltod führen (Earnshaw et al., 1999; Wang und Lenardo, 2000).

1.5. Problemstellung

HPV-16 E5 mRNA wird in großer Menge in CIN Läsionen (Kell et al., 1994; Stoler et al., 1992) und Zervixabstrichen infizierter Frauen gefunden (Biswas et al., 1997), was darauf schließen lässt, dass HPV-16 E5 eine Rolle während der frühen viralen Infektion und bei der zellulären Transformation spielt. Es ist bereits bekannt, dass das virale E5 Protein auf die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion und auf die Zell-Zell Kommunikation über sog. „gap-junctions“ Einfluss nimmt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Charakterisierung der Funktion von HPV-16 E5. Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass E5 die Apoptose beeinflusst, wodurch möglicherweise erklärt werden könnte, warum eine HPV-16 Infektion zu einer neoplastischen Transformation und Krebsentstehung führen kann. Darüber hinaus ergab die detaillierte Analyse dieser hier entdeckten Funktion des viralen E5 Proteins mögliche Ansatzpunkte für neue antivirale Strategien.

2. Abkürzungen

2.1. Allgemeine Abkürzungen

α -	Anti-
A	Ampere
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerytrol
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP (2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphate)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	N, N, N', N'-Tetraacetic acid
GFP	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-2-ethanesulfonic acid)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
MES	[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid]
MF	Minifuge 2, Heraeus Christ
min	Minute
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet-P40
OD	Optische Dichte
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
Tris	(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)
TZ	Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge TL-100, Beckman
V	Volt
ZZ	Zellkultur-Zentrifuge 03400, Heraeus Christ

2.2. Abkürzungen in der Signaltransduktion

Apaf-1	<u>A</u> poptotic <u>P</u> rotease <u>A</u> ctivating <u>F</u> actor-1
ATF-2	<u>A</u> ctivating <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor-2
Bcl	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma

Cdc42	<u>C</u> ell <u>D</u> ivision <u>C</u> ycle Protein 42
CIN	<u>C</u> ervical <u>I</u> ntraepithelial <u>N</u> eoplasia
CRIB	<u>C</u> dc42/ <u>R</u> ac <u>I</u> nteractive <u>B</u> inding
DcR	<u>D</u> eco <u>y</u> <u>R</u> ec <u>e</u> ptor
DD	<u>D</u> eath <u>D</u> omain
DED	<u>D</u> eath <u>E</u> ffector <u>D</u> omain
DISC	<u>D</u> eath-inducing <u>S</u> ignaling <u>C</u> omplex
DR	<u>D</u> eath <u>R</u> ec <u>e</u> ptor
EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
EGFR	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> ec <u>e</u> ptor
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ERK	<u>E</u> xtracellular Signal-regulated <u>K</u> inase
FADD	<u>F</u> as-associated <u>D</u> eath <u>D</u> omain Protein
FasL	Fas ligand (=CD95L/APO-1L)
FLICE	<u>F</u> ADD-like <u>I</u> CE (=Caspase-8)
FLIP	<u>F</u> LICE (=Caspase-8) <u>I</u> nhibitory <u>P</u> rotein
GAP	<u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein
GEF	<u>G</u> uanine nucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actor
HGSIL	<u>H</u> igh <u>G</u> rade <u>S</u> quamous <u>I</u> ntraepithelial <u>L</u> esion
IAP	<u>I</u> nhibitors of <u>A</u> poptosis <u>P</u> rotein
ICC	<u>I</u> nvasive <u>C</u> ervical <u>C</u> arcinoma
ICE	<u>I</u> nterleukin-1 β -converting <u>E</u> nzyme (=Caspase-1)
IL-1	<u>I</u> nterleukin-1
JNK	c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inase
LCR	<u>L</u> ong <u>C</u> ontrol <u>R</u> egion
LGSIL	<u>L</u> ow <u>G</u> rade <u>S</u> quamous <u>I</u> ntraepithelial <u>L</u> esion
MAPK	<u>M</u> itogen-activated <u>P</u> rotein <u>K</u> inases
MLK	<u>M</u> ixed- <u>L</u> ineage <u>K</u> inase
OPG	<u>O</u> steoprotegerin
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> ead <u>e</u> ng <u>F</u> rame
PAK	p21-activated kinase
PARP	<u>P</u> oly (<u>A</u> DP <u>R</u> ibose) <u>P</u> olymerase
Rac1	<u>R</u> as-related <u>C</u> 3 botulinum toxin substrate
SAPK/JNK	<u>S</u> tress-activated <u>P</u> rotein <u>K</u> inases/c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inases
Smac/	<u>S</u> econd <u>M</u> itochondria-derived <u>A</u> ctivator of <u>C</u> aspases/
DIABLO	<u>D</u> irect <u>I</u> AP-binding Protein with low pI
TNF α	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor α
TRAIL	<u>T</u> NF-related <u>A</u> poptosis-inducing <u>L</u> igand (=APO-2L)
URR	<u>U</u> pstream <u>R</u> egulatory <u>R</u> egion
VLP	<u>V</u> irus-like <u>P</u> article

2.3. Synonyme in der Signaltransduktion

Caspase-3 (=CPP32/Yama/Apopain)
 Caspase-8 (=FLICE/MACH/MCH5)
 Caspase-9 (=ICE-LAP6/Mch6/Apaf-3)
 Cytochrom c (Apaf-2)
 FADD (=MORT1)
 Fas (=CD95/APO-1)
 FasL (=CD95L/APO-1L)
 FLIP (=CASH/Casper/CLARP/FLAME/I-FLICE/MRIT/Usurpin)

TRAIL (=APO-2L)
TRAIL-R1 (=DR4)
TRAIL-R2 (=DR5/TRICK2/KILLER/APO-2)
TRAIL-R3 (=DcR1/TRID/LIT)
TRAIL-R4 (=DcR2/TRUNDD)

3. Material

3.1. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind kommerziell von folgenden Firmen erhältlich: GIBCO BRL, Merck, Roth, Serva und Sigma.

3.2. Zelllinien

Name	Herkunft	Quelle
A31-E5 und A31-Neo	3T3-A31 Mausfibroblasten, die konstitutiv HPV-16 E5 exprimieren oder mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren	G. Matlaszewski Leechanachai et al., 1992
Cos7	Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze	ECACC Nr. 87021302
HaCaT/E5 und HaCaT/pMSG	humane Keratinocyten, die HPV-16 E5 unter der Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promotors exprimieren oder mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren	N. Fusenig bzw. B. Steuer (DKFZ) Boukamp et al., 1988
Primäre Fibroblasten	Primäre humane Gingivafibroblasten, isoliert aus Patienten der Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitäts-Mund-Zahn und Kieferklinik	P. Tomakidi (Universität Heidelberg)

3.3. Bakterien

E.coli BL21 (Pharmacia Biotech) Genotyp: F⁻, *ompT*, *hsdS* (r_B⁻, m_B⁻), *gal* (38,39). Protease-defizienter *E.coli* Stamm zur Expression der GST-Fusionsproteine.

3.4. Zellkultur-Medien und -Zusätze

Name	Herkunft
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamin	GIBCO BRL
10% Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories
1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	GIBCO
Keratinocyte Growth Medium (KGM):	
500 ml Keratinocyte Basal Medium (KBM)	Bio Whittaker
0,5 ml human Epidermal Growth Factor (hEGF; 0,1 µg/ml)	Bio Whittaker
0,5 ml bovine Insulin (5 mg/ml)	Bio Whittaker
0,5 ml Hydrocortison (0,5 mg/ml)	Bio Whittaker
0,5 ml Gentamicin/Amphotericin-B (GA-1000)	Bio Whittaker
2 ml bovine Pituitary Extract (BPE; 7,5 mg/ml)	Bio Whittaker
FAD Medium für die <i>Raft</i> -Kulturen:	
375 ml DMEM FG 0435	Seromed
125 ml Ham's F-12 FG4815	Seromed
KGM-2 Zusätze (wie oben, plus 2 weitere)	Bio Whittaker
0,5 ml Transferrin	Bio Whittaker
0,5 ml Epinephrin	Bio Whittaker
5% FCS	PAA Laboratories

Name	Herkunft
10×Hank's Salzlösung	Seromed
0,25% Trypsin, 1 mM EDTA (Trypsin/EDTA)	GIBCO BRL
Dexamethason	Sigma
D-Sorbitol (98%)	Sigma
human Epidermal Growth Factor (hEGF)	Boehringer (Roche)
KillerTRAIL™ [rhsAPO-2L]	Alexis
SuperFas Ligand™ [rhsSUPERFasLigand]	Alexis
Tyrphostin AG 1478	Calbiochem
SB 203580	Calbiochem
Toxin B von <i>Clostridium difficile</i>	I. Just (Uni Hannover)

3.5. Bakterienkultur

Luria-Bertani Broth (LB-Medium)	
0,50% (w/v)	Bacto-Hefe-Extrakt
1,00% (w/v)	Bacto-Trypton
1,00% (w/v)	Natriumchlorid
0,25% (w/v)	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
	H ₂ O

LB ^{amp} -Medium	
0,1 mg/l	Ampizillin
	LB-Medium

LB ^{amp} -Agar	
1,5%	Bacto-Agar
0,1 mg/l	Ampizillin
	LB-Medium

3.6. Plasmide

Zur Expression der GST-Fusionsproteine wurde der pGEX-2T Vektor (27-4801-01, Pharmacia Biotech) verwendet.

Name	Herkunft
GST-c-Jun und GST-ATF-2	P. Angel (DKFZ)
GST-PBD; AS 67-150 aus humanem PAK1	G. Bokoch, California
GST-RBD; AS 1-149 aus humanem c-Raf	J. Collard, Amsterdam

3.7. Antikörper

3.7.1. Erstantikörper

Name	Spezifität	Herkunft
α-CDC42 P1 sc-87	α- human CDC42, rabbit IgG	Santa Cruz
α-Rac1 C-14	α- human Rac1, rabbit IgG	Santa Cruz
α-Fas C-20	α- human Fas, C-20, rabbit IgG	Santa Cruz
α-phospho-p38	α- human Peptid phospho-Thr180/Thr182 rabbit IgG	Cell Signaling
α-p38	α- human Peptid p38 (aa341-360), rabbit IgG	Cell Signaling
α-PARP	α- human PARP C-2-10, Hybridomaüberstand	Kaufmann et al., 1993

Name	Spezifität	Herkunft
α -phospho-SAPK/JNK	α - human Peptid phospho-Thr183/Thr185 rabbit IgG	Cell Signaling
α -Casp.-3, CPP32, Yama, Apopain	rabbit IgG, erkennt gespaltene und ungespaltene Caspase-3	BD PharMingen
α -Caspase-9	α - human Peptid, rabbit IgG, erkennt gespaltene und ungespaltene Caspase-9	Cell Signaling
α -cleaved Casp.-3 (D175)	α - human Peptid, rabbit IgG, erkennt nur gespaltene Caspase-3	Cell Signaling
α -Cytochrome c	7H8.2C12, mouse monoclonal IgG _{2b}	BD PharMingen
α -EGFR (1005)	rabbit IgG, sc-03	Santa Cruz
α -Ras	α - human Ha-Ras, mouse monoclonal IgG ₁ , clone 18	BD Transduction Laboratories
α -Phosphotyrosin	α -Phosphotyrosin, mouse monoclonal IgG _{2bK} , clone 4G10	Upstate Biozol
α -TRAIL (2E5)	α - human TRAIL (aa95-281), neutralisiert rhsTRAIL, mouse monoclonal IgG ₁ , 2E5	Alexis
α -DR4	α - human TRAIL-R1, HS101, mouse monoclonal IgG ₁	Alexis
α -DR5	α - human TRAIL-R2, HS201, mouse monoclonal IgG ₁	Alexis
α -FADD	α - human FADD, mouse monoclonal IgG ₁ , clone 1F7	Upstate Biozol
α -Apo-1	α - human Fas, mouse monoclonal IgG	Trauth et al., 1989
α -human CD95	α - human CD95, mouse monoclonal IgG	Cymbus Biotechnology
α -Caspase-8	α - human Caspase-8 C15, mouse IgG _{2b} , Hybridomaüberstand	Scaffidi et al., 1997
α -FLIP	α - human c-FLIP NF6, mouse IgG ₁ , Hybridomaüberstand	Scaffidi et al., 1999

3.7.2. Zweitantikörper

Name	Herkunft
goat- α -mouse IgG (Fab specific), Peroxidase-konjugiert	Sigma
goat- α -rabbit IgG (whole molecule), Peroxidase-konjugiert	Sigma
AffiniPure goat- α -mouse IgG, Fc-Fragment spezifisch, Peroxidase-konjugiert	Dianova
AffiniPure goat- α -rabbit IgG, Fc-Fragment spezifisch, Peroxidase-konjugiert	Dianova
goat- α -rabbit IgG, Alexa 488-konjugiert	Molecular Probes
goat- α -mouse IgG, FITC-konjugiert	Dianova
“Phalloidin-Alexa 568” (kein Antikörper)	Molecular Probes

3.8. Radioaktive Verbindungen

Redivue™ p³²-γ-ATP (10 μCi/μl)
 p³²-γ-GTP (10 μCi/μl; 2pmol/μl)
 Redivue™ p³²-α-dCTP (10 μCi/μl)

Amersham Pharmacia Biotech
 Amersham Pharmacia Biotech
 Amersham Pharmacia Biotech

3.9. Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind kommerziell von folgenden Firmen erhältlich: GIBCO BRL, New England Biolabs und MBI Fermentas.

3.10. Kits

Name	Herkunft
DC Protein Assay	Bio-Rad
RNeasy Mini Isolation Kit	Qiagen
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Kit	Qiagen
QIAgen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
ECL+Plus™ chemiluminescence Kit	Amersham
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche
Wizard™ DNA Clean-up Kit	Promega

3.11. Verbrauchsmaterialien

Name	Herkunft
Complete™, EDTA-free, protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Full Range Rainbow™ recombinant protein molecular weight marker	Amersham
Smart Ladder	Eurogentec
6er well Zellkulturschalen	TPP
24er well Zellkulturschalen	Costar
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf
Röhrchen zum Einfrieren von Zellen	Nalgene
Schwarz/weiß Film, 400 ASA	Kodak
Sterilfilter	Millipore
Zellkulturschalen (10cm Ø)	Greiner
Zellschaber	Costar

3.12. Geräte

Name	Herkunft
Analysenwaage GT 410	neoLAB
Bachhofer-Ofen	Bachhofer
Brutschrank	Labotect
Entwicklermaschine AGFA Classic E.O.S.	AGFA
FACSort	Becton Dickinson
FRIGOCUT 2800	Reichert-Jung
Gene Pulser™	Bio-Rad
Mikroskope LEICA DMRD und TCS SP	Leica
(MF) Minifuge 2	Heraeus Christ
PCR Minicycler™	MJ Research
Pospholmager	Molecular Dynamics
Proteingelkammern	cti GmbH
RC5C (SLA 3000 bzw. HB-6 Rotor)	Sorvall
Sterile Werkbank BSB 4A	Gelaire
(TZ) Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Ultraschall-Gerät Sonifier W-250	Branson
UV Stratalinker™ 2400	Stratagene
(UZ) Ultrazentrifuge TL-100 (TLA-100.3 Rotor)	Beckman
(ZZ) Zellkultur-Zentrifuge 03400	Heraeus Christ

3.13. Puffer

PBS (phosphate buffered saline)	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
1,8 mM	KH ₂ PO ₄
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	H ₂ O
Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen	

10×TAE-Puffer	
400 mM	Tris
20 mM	Natriumacetat
10 mM	EDTA
	H ₂ O
Mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen	

10×TBS (Tris buffered saline)	
200 mM	Tris
1,37 M	NaCl
	H ₂ O
Mit HCl auf pH 7,6 einstellen	

6×DNA-Ladepuffer	
30,00% (w/v)	Glycerin
0,25% (w/v)	Bromphenolblau
0,25% (w/v)	Xylencyanol
	H ₂ O

4. METHODEN

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Präparation in kleinem Maßstab („Miniprep“) wurde der „QIAprep Spin Kit“ (Qiagen, Hilden) benutzt, der eine Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA ermöglicht. Für die Gewinnung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA („Maxiprep“) wurde der „QIAgen Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Konzentrationsbestimmung der wässrigen DNA-Lösungen erfolgte photometrisch, wobei gegen einen Blindwert von *a. bidest* die Absorption in einer Quarzküvette bei 260 nm Wellenlänge gemessen wurde (1 cm Lichtweg).

Hierbei gelten folgende Richtwerte:

DNA (einzelfsträngig): $OD_{260nm} = 1$ entspricht 40 µg DNA/ml

DNA (Oligonukleotide): $OD_{260nm} = 1$ entspricht 20 µg DNA/ml

DNA (doppelsträngig): $OD_{260nm} = 1$ entspricht 50 µg DNA/ml

(Sambrook et al., 1989).

Der Reinheitsgrad der isolierten DNA lässt sich aus dem Quotienten der gemessenen Werte OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmen und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.1.2. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA mit Endonukleasen

Mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsendonukleasen wurde doppelsträngige Plasmid-DNA zur Kontrolle und Analyse geschnitten. Hierbei wurden in einem vollständigen Verdau 0,5 µg DNA in einen Ansatz von 10 µl Gesamtvolumen mit 3 Einheiten Restriktionsenzym und 1 µl 10×konzentriertem Restriktionspuffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für ca. 90 min bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

Für quantitative Ansätze wurde das Gesamtvolumen auf 50 µl erhöht und bis zu 5 µg DNA eingesetzt.

4.1.3. Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese

Die DNA-Fragmente der Restriktionsansätze wurden mit 6×DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard durch Elektrophorese in einer Agarosegelkammer (AGS, Heidelberg) nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 1-2%ige TAE-Agarosegele mit 0,75 µg/ml zugesetztem Ethidiumbromid unter TAE-Puffer bei 100V gefahren und die Banden anschließend im UV-Licht bei 302 nm zur Dokumentation fotografiert. Bei der präparativen Gel-Elektrophorese wurde die gewünschte Bande im UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten und zur anschließenden Elution in ein Eppendorfgefäß überführt.

TAE-Puffer

siehe 3.13.

6×DNA-Ladepuffer

siehe 3.13.

4.1.4. Elution von DNA-Fragmenten

Für die Gewinnung definierter DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde der „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet und nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

4.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation linearisierter Vektor-DNA mit Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Dabei wurden Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:10 in der Reaktion eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 15 µl wurde der Ligationsansatz, der neben der geschnittenen DNA noch 1,5 µl 10×konzentrierten Ligationspuffer, 1 mM ATP und 1 Einheit T4-DNA-Ligase enthielt, bei 16°C über Nacht im Wasserbad inkubiert (Sambrook et al., 1989).

4.1.6. Transformation von *E. coli*

Die Transformation mit Plasmid-DNA wurde mit BL21 Zellen durchgeführt, die zuvor elektrokompotent gemacht worden waren.

Herstellung elektrokompentener Bakterien

1 l LB-Medium (auf 37°C vorgewärmt) wurde mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden auf vier 250 ml-Zentrifugenbecher verteilt, 15 min

auf Eis gekühlt und bei 5000 rpm und 4°C für 20 min sedimentiert (RC5C, Sorvall, Rotor SLA 3000). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 1000 ml kaltem *a. bidest* aufgenommen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Sediment nochmals mit kaltem *a. bidest* gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 40 ml 10%igem Glycerol (4°C) aufgenommen und bei 2500 rpm, 4°C für 10 min sedimentiert (RC5C, Sorvall, Rotor HB-6). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml kaltem 10%igem Glycerol resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden zu je 50 µl in Eppendorfgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit 1-2 µl des Ligationsansatzes in Elektroporationsküvetten (Gene Pulser®/E. coli Pulser™ Cuvette, Bio-Rad, München) mit einer Spaltbreite von 0,2 cm gefüllt. Es wurde dann ein einzelner Puls von 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω gegeben (Gene Pulser, Bio-Rad, München), sofort danach 1 ml LB-Medium zugesetzt und die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 1 h bei 37°C wurden 100 und 900 µl auf LB^{amp}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Medium
LB^{amp}-Agar

siehe 3.5.
siehe 3.5.

Herstellung von Glycerinzellen

Zur längeren Aufbewahrung von Bakterien wurden diese im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (86%) vermischt und bei -20°C gelagert.

4.1.7. RNA-Extraktion aus HaCaT Zellen

Für die Isolierung der gesamten RNA aus HaCaT Zellen wurde der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) verwendet.

Konfluente Zellen in 10 cm Schalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 600 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol lysiert und abgekratzt. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule gegeben und die DNA durch Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm (TZ) gesichert. Es wurde 1 Volumen 70% Ethanol zugegeben und 15 Sekunden bei 14000 rpm (TZ) über „RNeasy-Mini-spin“-Säulen zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde dann

einmal mit 700 µl RW1 Puffer und im folgenden zweimal mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen. Dabei wurde beim letzten Waschschrift 2 min bei 14000 rpm (TZ) zentrifugiert. Um die Säule zu trocknen, wurde zusätzlich 1 min bei 14000 rpm (TZ) zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde im Anschluss mit 50 µl RNase-freiem H₂O durch 1minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm (TZ) eluiert und bei –80°C eingefroren.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in wässriger Lösung wurde die Absorption der Nukleinsäure in einer Quarzküvette bei 260 nm im Spektral-photometer gemessen.

Es gilt folgender Richtwert: $OD_{260nm} = 1$ entspricht 40 µg RNA/ml

4.1.8. Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription der isolierten mRNA in komplementäre cDNA wurde mit dem „RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit“ (MBI, Fermentas) durchgeführt.

Zu 1 µg RNA wurde 1 µl Oligo-(dT)₁₈-Primer (0,5 µg/µl) pipettiert und mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Nach 5 min Erhitzen auf 70°C wurden auf Eis folgende Komponenten zugegeben:

4 µl	5×Reaktionspuffer
1 µl	Ribonuklease Inhibitor (20U/µl)
2 µl	dNTP Mix (10 mM)

Nach einer 5minütigen Inkubation bei 37°C wurde 1 µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase (200U/µl) zugegeben und 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10 min gestoppt und auf Eis abgekühlt. Die erhaltene cDNA wurde mit H₂O im Verhältnis 1:1 verdünnt und 10 µl für die nachfolgende PCR eingesetzt.

4.1.9. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine spezifische, exponentielle Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes, der von zwei Oligonukleotid-Primern begrenzt ist, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind (K.B. Mullis, 1986). Für die Amplifikation der E5-cDNA wurden die Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas) und spezifische E5-Primer (siehe unten) verwendet. Als Positivkontrolle wurde 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, die

das E5 Gen enthielt. Als Negativkontrollen wurde zum einen H₂O, zum anderen 1 µg RNA (ohne vorangehende RT) verwendet.

<u>Reaktionsansatz:</u>	10 µl	cDNA aus RT
	1 µl	Primer 1 (10 µM/µl)
	1 µl	Primer 2 (10 µM/µl)
	4 µl	dNTP Mix (2,5 mM/µl)
	5 µl	10×PCR-Puffer
	3 µl	MgCl ₂ (25 mM)
	25,5 µl	H ₂ O
	0,5 µl	Taq-Polymerase (5U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde mit 20 µl Paraffinöl überschichtet und unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Schritt	Temperatur	Zeit	} 33×
1.	95°C	2 min	
2.	95°C	1 min	
3.	57°C	1 min	
4.	68°C	1 min	
5.	68°C	6 min	

HPV-16 E5 Primer 1 (1-20):

5' ATGACAAATCTTGATACTGC 3'

HPV-16 E5 Primer 2 (239-220):

5' AAGCGTGCATGTGTATGTAT 3'

Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und bei –20°C eingefroren bzw. 10 µl Aliquots für das analytische Gel abgenommen (siehe 4.1.3.).

4.1.10. RNA-Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurden denaturierende Formaldehyd-Agarosegele verwendet: 1,5 g Agarose wurden in 85 ml H₂O aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 10 ml 10×MOPS-Puffer und 5,4 ml 37% Formaldehyd (entspricht 0,6 M) zugegeben. Zwischen 20-60 µg RNA wurden vakuumgetrocknet, in 20 µl Probenpuffer aufgenommen und anschließend bei

65°C für 20 min denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen, wobei die äußerste Spur später als Kontrolle gefärbt und nicht geblottet wurde (siehe 4.1.11.).

Die Gel-Elektrophorese wurde bei RT in 1×MOPS-Puffer bei 70-80V durchgeführt, bis die Bromphenolfarbfrent auf 1 cm den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

RNA-Probenpuffer

720 µl	Formamid
160 µl	10×MOPS-Puffer
260 µl	37% Formaldehyd
180 µl	H ₂ O
100 µl	80% Glycerol
80 µl	gesättigte Bromphenollösung

10×MOPS-Puffer

0,4 M	Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)
0,1 M	Natriumacetat
10 mM	EDTA-Na ₂ ·2 H ₂ O
Der pH wurde mit NaOH auf 7,2 eingestellt	

4.1.11. Northern Blot Analyse

Nach der Elektrophorese wurde die äußerste Spur vom restlichen Gel abgetrennt, für 10 min in Toluidinblau-Lösung (0,1% in H₂O) angefärbt und anschließend mit H₂O gewaschen bis die 18S (ca. 1,9 kb) und 28S (ca. 4,7 kb) RNA sichtbar wurde. Anhand der Laufstrecke dieser beiden Banden konnte die Transkriptlänge später überprüft werden.

Das restliche Gel wurde mehrmals in H₂O gewaschen, bis der Formaldehyd-Geruch nicht mehr wahrnehmbar war, und dann in 10×SSC gelegt. Währenddessen wurde eine Gene Screen Plus-Membran kurz in H₂O gelegt und dann 15 min ebenfalls in 10×SSC equilibriert. Anschließend wurde ein Kapillarblot in 10×SSC als Transferpuffer aufgebaut (Sambrook et al., 1989).

Der Transfer der RNA erfolgte bei RT über Nacht. Als Kontrolle wurde das Gel anschließend in Toluidinblau-Lösung angefärbt (siehe oben). Der Blot wurde kurz in 2×SSC gewaschen, um eventuelle Agarosereste zu entfernen und an der Luft getrocknet. Zur Fixierung der RNA wurde ein UV-Crosslinking mit dem UV Stratalinker™ 2400 (Stratagene) durchgeführt (Automatic: 1200 µJoule × 100). Anschließend wurde der Blot für 2-3 h in der Prehybridisierungs-Lösung

bei 42°C im Bachhofer-Ofen inkubiert. Die Hybridisierung mit der für ein Gentranskript spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (siehe 4.1.11.1) erfolgte über Nacht bei 42°C in der Hybridisierungs-Lösung. Am nächsten Tag wurde der Blot bei RT für 5 min in 2×SSC+0,1%SDS gewaschen und anschließend bei 65°C zweimal für je 30 min in 2×SSC+0,1%SDS und zuletzt für 10 min bei 65°C in 0,1×SSC+0,1%SDS gewaschen. Danach wurde der Blot in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (BioMax™ MS, Kodak) mit Verstärkungsfolie bei –80°C aufgelegt. Eine Quantifizierung der Banden wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers durchgeführt.

10×SSC	
1,5 M	NaCl
0,15 M	Natriumcitratdihydrat

100×Denhardt's-Lösung	
2%	Ficoll 400
2%	BSA
2%	Polyvinylpyrrolidon

Prehybridisierungs-Lösung	
50%	Formamid
1%	SDS
10%	Natriumdextransulfat (MW 500000)
5×	SSC
5×	Denhardt's-Lösung

Hybridisierungs-Lösung	
100 µg/ml	ssDNA in Prehybridisierungs-Lösung

ssDNA	
2 mg/ml	Lachsspermien-DNA (Sigma) in 0,15 M NaCl gelöst, 15 min Ultraschall, 15 min aufkochen, abkühlen und bei –20°C lagern

4.1.11.1. Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Mit dem „Random Primed DNA Labeling Kit“ (Roche) wird an eine zu markierende DNA eine Mischung aus Hexanucleotiden verschiedener Basensequenzen hybridisiert. Der komplementäre Strang wird im Anschluss von den 3' Enden der „random primer“ mit Hilfe des Klenow-Enzyms synthetisiert, wobei p³²-α-dCTP in den neuen Strang eingebaut wird.

Zunächst wurden 25 ng der linearisierten DNA mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt und für 5 min bei 95°C denaturiert, bevor zu der in Eis abgekühlten DNA 3 µl dNTPs (dATP/dGTP/dTTP je 0,5 mM), 2 µl Hexanucleotid-Gemisch (in 10×Reaktionspuffer), 1 µl Klenow-Enzym (2U/µl) und 4 µl p³²-α-dCTP (10 µCi/µl) zugegeben wurden. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C durchgeführt.

Die Aufreinigung der Sonde erfolgte mit Hilfe des „Wizard™ DNA Clean-up Kits“ (Promega): Zu dem Markierungsansatz wurden 600 µl „Purification Resin“ zugegeben und das Gemisch über eine 1 ml Spritze auf eine „Wizard™“ Mini-Säule aufgetragen. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde mit 1 ml 80% Isopropanol gewaschen und kurz zentrifugiert, bevor sie trocknen gelassen wurde. Zur Elution wurden 150 µl TE-Puffer auf die Säulenmatrix gegeben, für 1 min inkubiert und anschließend 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert (TZ). Die gereinigte Sonde wurde vor der Zugabe zur Hybridisierungs-Lösung für 10 min bei 95°C denaturiert.

TE-Puffer (pH 8,0)	
10 mM	Tris
1 mM	EDTA

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Zellkulturtechniken

4.2.1.1. Kultivierung von HaCaT Zellen als Monolayer

Zur Untersuchung der Funktion des HPV-16 E5 Proteins wurde die spontan immortalisierte humane Keratinocyten Zelllinie HaCaT („Human adult low Calcium high Temperature“; Boukamp et al., 1988) verwendet, die aus dem Randbereich eines Melanoms entstammt. Bei diesen epithelialen Zellen handelt es sich zwar nicht um Zervixkeratinocyten, aber dennoch um ein ausreichendes Modellsystem zur Analyse von E5. Da sich HaCaT Zellen nur sehr schlecht transient transfizieren lassen, waren in unserem Labor zwei stabile Zelllinien hergestellt worden (Oelze et al., 1995). HaCaT/E5 Zellen exprimieren das HPV-16 E5 Gen unter der Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren MMTV LTR-Promotors („Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat“),

HaCaT/pMSG Zellen wurden als Kontrollzelllinie mit dem leeren Vektor transfiziert. Der pMSG Expressionsvektor der Firma Amersham Pharmacia Biotech enthält für die Selektion in eukaryontischen Zellen das *E. coli* Gen für die Xanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (gpt), das vom SV40 Early Promotor exprimiert wird. Da die Zellen nach erfolgreicher Selektion nicht mehr permanent unter Selektionsdruck gehalten wurden, musste die Expression von E5 routinemäßig durch den Nachweis der mRNA mittels RT-PCR oder Northern Blot kontrolliert werden. In den meisten Experimenten wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% Fetal Calf Serum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO) bei 37°C und 5% CO₂ Begasung kultiviert. Nur die Zellen, bei denen Apoptose durch TRAIL- und FasL-Behandlung ausgelöst werden sollte, wurden vorher in Keratinocyte Growth Medium (KGM) kultiviert. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% angezüchtet, bevor sie für 48 h mit DMEM ohne FCS zusammen mit 1 µM Dexamethason (Sigma) ausgehungert wurden. Das Aushungern diente zum einen dazu, alle Zellen in den Ruhezustand des Zellzyklus zu bringen, und zum anderen der vollständigen Entfernung von Wachstumsfaktoren aus dem Medium, um zu gewährleisten, dass die Basisaktivität der Kinasen und anderer zellulärer Enzyme besonders gering ist. Dies ist notwendig, da sonst schwache Aktivierungen in der Signalkaskade nicht wahrgenommen werden können.

Für die Weiterkultur wurden die Zellen für 15 min mit 0,05% EDTA/PBS bei 37°C inkubiert, bevor Trypsin/EDTA für 2-3 min zugegeben wurde. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurden sie mit einer Pasteurpipette vereinzelt und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue 10 cm Schalen verteilt.

4.2.1.2. Kultivierung von A31 Mausfibroblasten als Monolayer

Um die Wirkung von HPV-16 E5 zu untersuchen, wurden als zusätzliche Zelllinien die Mausfibroblasten A31-E5 und A31-Neo (Leechanachai et al., 1992) verwendet. Bei den A31-E5 handelte es sich um Zellen, die das E5 Gen permanent exprimieren; die A31-Neo Zellen dienten nach stabiler Transfektion mit dem leeren Vektor als Referenz. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (10000U/ml; GIBCO) bei 37°C und 5% CO₂

Begasung bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, bevor sie für 24 h mit DMEM ohne FCS ausgehungert wurden.

Für die Weiterkultur wurden die Zellen für 2-3 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, mit einer Pasteurpipette vereinzelt und im Verhältnis 1:10 bis 1:15 auf neue 10 cm Schalen verteilt.

4.2.1.3. Kultivierung von Cos7 Affennierenepithelzellen als Monolayer

Diese Zellen wurden wie die A31 Mausfibroblasten kultiviert und für transiente Transfektionen mit Plasmid-DNA von HA-E5, FLAG-E5 und GFP-E5 eingesetzt (siehe 4.2.2.1.).

4.2.1.4. Kultivierung von HaCaT Zellen als *Raft*-Kulturen

Mit der *Raft*-Kulturtechnik können HaCaT Zellen differenzieren und so ein mehrschichtiges, hautähnliches *in vitro* Epithelium bilden.

Im ersten Schritt wurde als Grundlage für die HaCaT Zellen ein Collagengel gegossen, in das primäre Fibroblasten eingebettet wurden. Dazu wurden subkonfluente Fibroblasten trypsinisiert, in DMEM mit 10% FCS aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für jeden Ansatz sollten $1,5-2 \times 10^5$ Zellen (hier: $2,25 \times 10^5$) pro ml Collagengel eingesetzt werden. Die entsprechende Menge an Zellen wurde daher bei 1200 rpm (ZZ) für 10 min zentrifugiert und in 100 µl FCS pro Ansatz resuspendiert. Parallel dazu wurde das lyophilisierte Collagen Typ I (IBM, Leipzig) in 0,2% Essigsäure resuspendiert (2-4 mg/ml; hier: 2 mg/ml), 10×konzentrierte Hank's Salzlösung zugegeben und der pH unter langsamem Rühren mit 5 M NaOH neutral eingestellt (Farbumschlag von gelb nach pink-orange). Die Zellsuspension wurde zugegeben und pro Ansatz 1 ml des Zell-Gel Gemisches pro 24er well verteilt. Zum Polymerisieren wurde das Gel für 10-20 min in den Brutschrank gestellt, bevor es mit 1 ml DMEM und 10% FCS überschichtet wurde.

Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe der Keratinocyten HaCaT/pMSG bzw. HaCaT/E5. Diese wurden trypsinisiert, in KGM mit 10% FCS aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für jeden Ansatz wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Die entsprechende Menge an Zellen wurde daher bei 1200 rpm (ZZ) für 10 min zentrifugiert und in 100 µl KGM mit 10% FCS pro Ansatz resuspendiert und auf das Gel getropft, bei dem zuvor das Medium

abgenommen worden war. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank wurde 1 ml FAD Medium (DMEM/Ham's F12; im Verhältnis 3:1) mit 5% FCS und verschiedenen Zusätzen (siehe 3.4.) zugegeben.

Am nächsten Tag wurden die Gelstückchen aus den 24er wells in 6er wells überführt. Dazu wurde in ein 6er well ein Metallgitter eingesetzt, auf das eine runde Filtermembran (Millipore) mit der glänzenden Seite nach unten gelegt wurde. Es wurden 6 ml FAD Medium mit 5% FCS und Zusätzen zugegeben, wobei darauf zu achten war, dass keine Luftblasen zwischen Gitter und Membran oder unter dem Gitter waren. Das Gel wurde mit einem Spatel aus dem 24er well herausgehoben und mit der Zellseite nach oben auf die Membran gesetzt. Es wurde weiteres FAD Medium zugetropft bis das Gel flotierte. Bei der Weiterkultur für ca. 5-20 Tage wurde alle 2-3 Tage die Hälfte des Mediums durch frisches FAD Medium ersetzt.

Wenn die Schichtdicke des Epitheliums ausreichend war, wurde es mit Tissue-Tek[®] Gefriermedium (O.C.T.[™] Compound, SAKURA) auf einer Korkunterlage in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf einen speziell beschichteten Objektträger (Super Frost*/Plus, Menzel-Gläser) aufgebracht. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.1.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen einer subkonfluenten 10 cm Schale wurden trypsinisiert wie oben beschrieben und für 5 min bei 1200 rpm (ZZ) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml kaltem FCS mit 10% DMSO resuspendiert und je 1 ml in ein Cryo-Röhrchen überführt. Damit die Zellen langsam einfrieren, wurden die Röhrchen mit Papiertüchern umwickelt, 1 h bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie endgültig in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

Zum schnellen Auftauen der Zellen wurden diese direkt nach der Entnahme aus flüssigem Stickstoff in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml warmem Kulturmedium in 10 cm Schalen ausgesät. Nach 4-5 h, wenn sich alle Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

4.2.2. Transfektion und transiente Expression in Eukaryonten

4.2.2.1. Transfektion von Cos7 Zellen mit dem FuGENE™ 6 Reagenz

Cos7 Zellen wurden in 6er wells (oder 10 cm Schalen) ausgesät und bis zur 50-80% Konfluenz kultiviert, bevor die transiente Transfektion durchgeführt wurde. Es wurden 94 μ l (bzw. 570 μ l) DMEM ohne Antibiotika und FCS in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und 4 μ l (bzw. 18 μ l) FuGENE™ 6 Reagenz (Roche) zugefügt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde das Gemisch zu 2 μ g DNA (bzw. 12 μ g) in ein zweites Eppendorfgefäß zugegeben, vorsichtig gemischt und für mindestens 15 min stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 2 ml (bzw. 8 ml) DMEM mit 10% FCS zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen getropft und durch Schwenken verteilt. Nach 48 h konnte die Expression des Proteins (z.B. GFP-E5) untersucht werden. Die Transfektionseffizienz lag durchschnittlich bei 60%.

4.3. Proteinchemische Methoden

4.3.1. Herstellung von Zellextrakten

4.3.1.1. SDS-Extrakte

Für Western Blot Analysen eignen sich SDS-Proteinextrakte sehr gut, da sie relativ unempfindlich gegenüber mehrmaligem Einfrieren und Auftauen sind. Zur Proteinextraktion wurde das Medium von den konfluenten Zellschalen entfernt und zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Dann wurde eine entsprechende Menge an 95°C heißem 1% SDS auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt (für 10 cm Schalen wurden 500 μ l SDS, für 6er wells 200 μ l SDS verwendet). Zum Scheren der DNA wurde die Zellsuspension zweimal über eine QIAshredder-Säule bei 14000 rpm (TZ) kurz zentrifugiert. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 10 μ l des Lysats entnommen, der Rest wurde bei -80°C eingefroren.

4.3.1.2. E1A-Extrakte

Für Immun- oder Affinitätspräzipitationen dürfen die Zellextrakte nur wenig Detergenz enthalten. Zur Stabilisierung der GTP-Form der kleinen G-Proteine Cdc42, Rac1 und Ras wurde dem Extraktbuffer Magnesiumchlorid zugefügt. Proteinextrakte mit diesem Puffer sind sehr empfindlich gegenüber mehrmaligem Einfrieren und müssen rasch aufgearbeitet werden.

Die transfizierten Cos7 Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit 200 bzw. 500 µl E1A-Puffer (mit Proteaseinhibitoren!) abgekratzt. Wie bei den SDS-Extrakten wurde die DNA durch Zentrifugation über eine QIAshredder-Säule geschert. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 10 µl des Lysats entnommen, der Rest wurde bei –80°C eingefroren.

Die GST-Fusionsproteine wurden nach der Aufreinigung aus den Bakterien ebenfalls in E1A-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert (höchstens eine Woche). Die Proteinkonzentration wurde hier durch das Anfärben eines Test-Gels mit Coomassie blau und Vergleich mit dem Marker geschätzt.

E1A-Puffer

250 mM	NaCl
0,1%	NP-40
50 mM	HEPES, pH 7,6
10 mM	MgCl ₂
Der Puffer wurde mit HCl auf pH 7,0 eingestellt und bei 4°C gelagert.	

Die Inhibitoren wurden vor Gebrauch zugegeben:

1:40	Proteaseinhibitoren (Complete™ Roche Diagnostic, Mannheim)
1 mM	Natriumorthovanadat (Sigma)

Färben von Protein mit Coomassie Brilliant Blue R (50 mg/Tablette; GERBU):

Färbelösung	4 Tabletten in 250 ml 10% Essigsäure
Entfärber	10% Essigsäure

4.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte erfolgte mit dem DC Protein Assay (Bio-Rad). Diese Methode beruht auf einer Folin-Reaktion nach Lowry. Die Proteine reagieren hauptsächlich über ihre Tyrosin- und Tryptophanreste im alkalischen Medium mit Kupfertartrat. Das Folin-Reagenz wird dann von diesem Protein-Kupfer Komplex reduziert, wobei charakteristische blaue Produkte mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm entstehen.

Es wurden jeweils 10 µl der Proteinextrakte mit H₂O in einem Reagenzglas auf 100 µl aufgefüllt und 490 µl Reagenz A sowie 10 µl Reagenz S zugegeben. Die Farbreaktion wurde durch Zufügen von 4 ml Reagenz B und Mischen auf dem Vortex gestartet. Nach 15-20 min Inkubation konnte die Farbentwicklung am Spektralphotometer bei 750 nm gemessen werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte anhand einer Eichkurve mit bovinem γ -IgG als Standard.

4.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Das Polyacrylamidgel setzte sich aus einem 4,5%igen Sammelgel und einem 10 bis 17,5%igen Trenngel zusammen. Die Proteinproben wurden mit 6×Probenpuffer (mit β -Mercaptoethanol) vermischt und vor dem Auftragen auf das Sammelgel für 5 min aufgekocht. Bei Immunpräzipitaten wurde 6×Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol verwendet, um die Dissoziation der Immunglobuline in ihre leichten und schweren Ketten zu vermeiden, da diese eventuell zu starken Signalen im Western Blot führen können. Die Auftrennung erfolgte je nach Proteingröße 1-3 Stunden bei 120-160V (kleines Gel) oder über Nacht bei 30-50V (großes Gel) in TGS-Puffer. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurden 15 µl Full Range RainbowTM recombinant protein molecular weight marker (Amersham, Braunschweig) aufgetragen.

Rotiphoresegel 30 (30%ige Acrylamidstammlösung AA mit 0,8% Bisacrylamid BA)

Trenngellösungen (für ein großes Gel)

	10%	12,5%	15%	17,5%
30% AA/0,8% BA	10 ml	12,5 ml	15 ml	17,5 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml
H ₂ O	8,15 ml	5,65 ml	3,15 ml	0,65 ml
10% SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
10% APS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Sammelgellösung (für ein großes Gel)

	4,5%
30% AA/0,8% BA	1,5 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	7 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	15 µl

6×Probenpuffer	
350 mM	Tris-HCl, pH 6,8
34,4%	Glycerin
10%	SDS
10%	β-Mercaptoethanol
0,06%	Bromphenolblau

10×TGS-Puffer (pH 8,3)	
30,3 g	Tris
144 g	Glycin
10 g	SDS
mit H ₂ O auf 1 l auffüllen	

4.3.4. Extraktion von Membran- und Cytosolproteinen

Je zwei 15 cm Durchmesser Schalen von konfluenten HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und 2 ml Lysepuffer pro Schale zugegeben. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgekratzt und mit einem Douncer-Homogenisator aufgeschlossen (20-30 Stöße, bis nur noch Zellkerne im Mikroskop sichtbar waren). Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm (MF) und 4°C wurden nicht-lysierte Zellen und Zellorganellen pelletiert. Der Überstand wurde anschließend in Polycarbonat-Röhrchen (Nalgene™

Ultra Tubes) überführt und bei $100000 \times g$ (UZ, TLA 100.3) für 1 h bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet wurde in 500 μl Lysepuffer aufgenommen und 10% SDS bis zu einer Endkonzentration von 1% SDS zugegeben. Zu den im Überstand enthaltenen cytosolischen Proteinen wurde ebenfalls SDS bis 1% Endkonzentration zugefügt. Der Proteingehalt in beiden Fraktionen wurde mittels DC Protein Assay (Bio-Rad) nach der Methode von Lowry bestimmt (siehe 4.3.2.).

Lysepuffer

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 mM	Natriumorthovanadat
1:40	Proteaseinhibitoren

4.3.5. Cytochrom c-Freisetzung

Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien stellt den Auslöser für die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges dar (siehe Einleitung). Konfluente HaCaT/pMSG und E5 Zellen in 10 cm Durchmesser Schalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und 500 μl Extraktbuffer pro Schale zugegeben. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgekratzt und wie in 4.3.1 beschrieben zweimal über eine QIAshredder-Säule bei 14000 rpm (TZ) kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die intakten Mitochondrien zusammen mit anderen Zellresten durch eine 10minütige Zentrifugation bei $10000 \times g$ und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dann in Polycarbonat-Röhrchen (Nalgene™ Ultra Tubes) überführt und bei $100000 \times g$ (UZ, TLA 100.3) für 1 h bei 4°C zentrifugiert, um Mikrosomen, an denen möglicherweise Cytochrom c haftet, abzutrennen. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 4.3.2.) wurden 10 μl des Überstandes, der nur noch cytoplasmatisches Cytochrom c enthält, entnommen; der Rest wurde bei -80°C eingefroren.

Extraktbuffer

20 mM	HEPES, pH 7,6
10 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂
1 mM	EDTA, pH 8,0
1 mM	Natriumorthovanadat
1:40	Proteaseinhibitoren

4.3.6. GST-Fusionsprotein Aufreinigung

Zur Isolierung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen aus Protease-defizienten Bakterien (*E. coli* Stamm BL21) wurden diese mit dem Expressionsvektor pGEX-2T transformiert (siehe 4.1.6.), der für verschiedene Fusionsproteine codierte (ATF-2, c-Jun, Cdc42, Rac1, human PAK1-PBD, human Raf1-RBD). Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem leeren Vektor transformiert worden waren und nur GST exprimierten.

Es wurden 500 ml LB^{amp}-Medium mit 5 ml der verschiedenen Übernachtskulturen angeimpft und bei 37°C bis zu einer optische Dichte OD_{600 nm} von ca. 0,5 angezüchtet. Zur Induktion der Fusionsprotein-Expression wurde 100 µM IPTG zugegeben und eine weitere Stunde auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch 10 min Zentrifugation bei 4000 rpm (RC5C, Sorvall, Rotor SLA 3000) und 4°C geerntet und auf Eis in 25 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach Behandlung mit Ultraschall (4× 30 Sekunden) wurde 1% Triton X-100 zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur rotiert, wodurch die GST-Fusionsproteine freigesetzt wurden. Die Zelltrümmer wurden durch 10 min Zentrifugation bei 12000 × g und 4°C abgetrennt. Zu dem proteinhaltigen Überstand wurden 250 µl einer 50%igen Glutathion-Sepharose® 4B Suspension (Pharmacia Biotech) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur rotiert. Während dieser Inkubation erfolgte die Bindung des Fusionsproteins mit seiner GST-Domäne an das komplementäre Glutathion. Die gebundenen Proteine wurden durch 5 min Zentrifugation bei 500 × g und 4°C präzipitiert und zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 250 µl E1A-Puffer mit Inhibitoren (siehe 4.3.1.2.) aufgenommen; es konnte so mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Auf einem kleinen 12,5%igen Polyacrylamidgel (siehe 4.3.3.) wurden jeweils 10 µl der isolierten Fusionsproteine aufgetrennt und in Coomassie blau angefärbt, um die Menge und Reinheit der Proteine zu bestimmen. Zur Dokumentation wurden die Gele bei 80°C im Vakuum für 2 h getrocknet.

LB^{amp}-Medium

siehe 3.5.

4.3.7. Affinitätspräzipitation der G-Proteine

Zur Isolierung von aktivierten G-Proteinen wurde eine Affinitätspräzipitation mit an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteinen (siehe 4.3.6.) durchgeführt, die eine p21-Bindungsdomäne PBD (AS 67-150 aus humanem PAK1) bzw. eine Ras-Bindungsdomäne RBD (AS 1-149 aus humanem c-Raf) enthielten, an die spezifisch nur die GTP beladenen Formen von Cdc42 und Rac1 bzw. Ras binden können. Es wurden jeweils 500 µg (oder mehr) E1A-Proteinextrakte (siehe 4.3.1.2.) mit E1A-Puffer auf ein gleiches Volumen aufgefüllt und je 10-30 µl der aufgereinigten GST-Fusionsproteine zugegeben. Dabei musste schnell auf Eis gearbeitet werden, da die GTP-gebundenen Formen bei Raumtemperatur nur eine Halbwertszeit von ca. 20 min haben. Als Kontrolle wurde GST ohne Fusionsproteinanteil eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 h bei 4°C rotiert und die gebundenen G-Proteine durch eine 5minütige Zentrifugation bei 3500 rpm (TZ) und 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde dann 4× mit je 500 µl kaltem E1A-Puffer gewaschen, mit 5-15 µl 3×Probenpuffer (siehe 4.3.3.) versetzt und auf ein großes 12,5% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei 40V.

4.3.8. *In vitro* Kinaseaktivitäts-Assay

Die Aktivität der Stresskinasen p38 und JNK wurde durch die Menge an radioaktiv phosphoryliertem Substrat gemessen. Konfluente HaCaT/pMSG und E5 Zellen in 10 cm Durchmesser Schalen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und 500 µl Kinase-Extrakt-puffer pro Schale zugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgekratzt und wie in 4.3.1. beschrieben zweimal über eine QIAshredder-Säule bei 14000 rpm (TZ) kurz zentrifugiert. Anschließend wurden je 500 µg der Zellextrakte mit Kinase-Extrakt-puffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt, in Polycarbonat-Röhrchen (Nalgene™ Ultra Tubes) überführt und bei 100000 × g (UZ, TLA 100.3) für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 1,5 µg p38 bzw. JNK Antikörpern für 1 h auf Eis inkubiert, bevor 25 µl Protein G-Sepharose (Pharmacia Biotech) zugegeben und die Ansätze für 3 h bei 4°C rotiert wurden. Durch eine 5minütige Zentrifugation bei 3500 rpm (TZ) und 4°C wurden die Präzipitate sedimentiert und 6× mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 10 µCi p³²-γ-ATP, 30-60 µg Substrat (ca. 10-20 µl) und

20 μ M ATP mit Kinase-Reaktionspuffer auf ein Volumen von 34 μ l pro Ansatz aufgefüllt und die Kinasereaktion bei 30°C für 20 min durchgeführt. Als Substrate für die Kinasereaktion wurden zuvor GST-Fusionsproteine der Transkriptionsfaktoren ATF-2 für p38 und c-Jun für JNK aufgereinigt (siehe 4.3.6.). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 11 μ l 6 \times Probenpuffer (siehe 4.3.3.) und 5 min Aufkochen bei 95°C gestoppt. Die Proben wurden über Nacht mittels SDS-PAGE auf einem 12,5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das anschließend bei 80°C im Vakuum für 2 h getrocknet wurde. Durch Auflegen eines Röntgenfilms (BioMax™ MS, Kodak) mit Verstärkungsfolie bei –80°C konnten die phosphorylierten Substrate mittels Autoradiographie nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung der Banden wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers durchgeführt.

Kinase-Extrakt-puffer	Waschpuffer	Kinase-Reaktionspuffer
25 mM HEPES, pH 7,6	25 mM HEPES, pH 7,6	20 mM HEPES, pH 7,6
3 mM β -Glycerophosphate	6,5 mM NaCl	20 mM MgCl ₂
3 mM EDTA, pH 8,0	0,1 mM EDTA, pH 8,0	25 mM β -Glycerophosphate
3 mM EGTA, pH 7,6	0,05% Triton X-100	2 mM DTE/DTT
250 mM NaCl	1 mM Natriumorthovanadat	1 mM Natriumorthovanadat
1% NP-40	1:40 Proteaseinhibitoren	
4 mM NaF		
1 mM Natriumorthovanadat		
1:40 Proteaseinhibitoren		

4.3.9. Overlay-Assay

Mit dieser Methode sollte untersucht werden, ob p³²- γ -GTP beladenes Rac1 oder Cdc42 als radioaktiv markierte Sonde dazu in der Lage ist, mit auf PVDF Membran gebundenem E5 Protein zu interagieren. E1A-Proteinextrakte wurden zusammen mit GST-PBD (Positivkontrolle), GST und BSA (Negativkontrollen) auf drei 15%igen Polyacrylamidgelen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membran geblottet. Diese wurden dann für 10 min in TBS gewaschen und mit 15 ml „Blocking Buffer“ für 1,5 h geblockt. Danach wurde der Puffer abgegossen und durch 10 ml „GTPase-binding Buffer“ ersetzt. Währenddessen wurden die Sonden hergestellt. Dazu waren zuvor die GST-Fusionsproteine GST-Rac1, GST-Cdc42 sowie GST aufgereinigt worden (siehe 4.3.6.). Die Proteine wurden während der GDP-GTP Austauschreaktion mit p³²- γ -GTP beladen und gleichzeitig mit 10 mM Glutathion (60 mM in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) von der Sepharose gespalten. Dazu wurden je 100 μ g (ca. 35-100 μ l) der

Proteine kurz zentrifugiert und das Pellet (15-30 μ l) zusammen mit 10 mM Glutathion, 100 μ Ci p^{32} - γ -GTP (entspricht 20 pmol), und 80 pmol rGTP mit „GTP-GDP Exchange Buffer“ auf 200 μ l aufgefüllt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die GDP-GTP Austauschreaktion wurde durch Zugabe von 15 mM $MgCl_2$ gestoppt und die Ansätze bei 3500 rpm (TZ) und 4°C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 5 μ l als Aliquot zurückbehalten und der Rest zu den 10 ml „GTPase-binding Buffer“ auf die Membran gegeben. Die Membranen wurden für 8 min mit den jeweiligen Sonden inkubiert und anschließend 3 \times für je 5 min in Waschpuffer gewaschen. Die Membranen wurden danach zwischen zwei Folien gelegt und ein Röntgenfilm (BioMaxTM MS, Kodak) mit Verstärkungsfolie bei –80°C für 3-4 h exponiert. Die 5 μ l Aliquots der Sonden wurden auf einem 12,5%igen Test-Gel aufgetrennt und mit Coomassie blau angefärbt, um den Erfolg der Spaltung mit Glutathion zu überprüfen.

Blocking Buffer	GTPase-binding Buffer
1% BSA	25 mM MES, pH 6,5
0,5 mM $MgCl_2$	50 mM NaCl
0,1% Triton X-100	5 mM $MgCl_2$
5 mM DTT	0,5 mM rGTP
in PBS	5 mM DTT
	in H_2O

GTP-GDP Exchange Buffer	Waschpuffer
20 mM Tris-HCl, pH 7,5	25 mM MES, pH 6,5
50 mM NaCl	5 mM $MgCl_2$
10 mM EDTA, pH 8,0	0,05% Triton X-100
in H_2O	in H_2O

4.4. Immunologische Methoden

4.4.1. Western Blot Analyse

Zur immunologischen Analyse wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (siehe 4.3.3.) vom Gel auf eine Nitrocellulose oder PVDF Membran übertragen. Hierbei wurde das Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewendet:

Für den Transfer auf PVDF Membran (0,45 μ m, ImmobilonTM-P, Millipore) wurde diese auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 15 Sekunden in Methanol,

2 min in H₂O und 5 min in EMBL-Puffer getränkt. Das Whatman® 3 MM-Papier und das Gel selbst wurden ebenfalls 5 min in EMBL-Puffer inkubiert.

EMBL-Puffer	
40 mM	Tris
39 mM	Glycin
0,0375%	SDS
20%	Methanol

Für den Transfer auf Nitrocellulose Membran (0,2 µm, Protran®, Schleicher & Schuell, Dabbel) wurde die zugeschnittene Membran wie auch das Gel in H₂O für 5 min inkubiert. Das 3 MM-Papier wurde dagegen in Transfer-Puffer getränkt.

Transfer-Puffer	
48 mM	Tris
39 mM	Glycin
0,037%	SDS
20%	Methanol

Die Komponenten des Blots wurden dann auf der Anode des “semi-dry-electroblotters” (cti GmbH) wie folgt aufgebaut:

Kathode
4× 3 MM-Papier
Polyacrylamid-Gel
Membran
4× 3 MM-Papier
Anode

Der Transfer wurde für 45 min bis 1,5 h bei 0,8 mA/cm² durchgeführt. Um die Effizienz der Übertragung zu überprüfen, konnten die Proteine für 2 min mit Ponceau-S (Sigma) rot angefärbt und durch mehrmaliges Waschen in PBS-T wieder entfärbt werden. Als weitere Kontrolle konnte das Gel nach dem Transfer in Coomassie blau angefärbt werden (siehe 4.3.1.2.).

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungskapazitäten für mindestens 1 h in 5-10% Magermilchpulver/PBS-T (0,05-0,1% Tween®20) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Für den immunologischen Nachweis von bestimmten Proteinen wurde ein

spezifischer Erstantikörper für mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Dabei wurde der Antikörper nach den Herstellerangaben in Blocking Buffer verdünnt und zur Konservierung 0,02% NaN₃ zugegeben. Anschließend wurde der Blot 5× für je 5 min mit PBS-T gewaschen und mit einem in 5% Milch/PBS-T verdünnten Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper (α -Kaninchen oder α -Maus) für 1-1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5maligem Waschen in PBS-T für je 5 min wurde eine Chemilumineszenz Reaktion nach den Herstellerangaben durchgeführt (ECL+Plus™, Amersham Pharmacia Biotech).

Die Darstellung der spezifischen Banden erfolgte durch Oxidation von Luminogen PS-3 acridan durch HRP und H₂O₂ in Acridiniumester Intermediate, die mit H₂O₂ unter alkalischen Bedingungen reagieren und dabei Licht der Wellenlänge 430 nm emittieren. Dieses Licht kann dann von einem geeigneten Autoradiographie-Film (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgefangen werden.

Je nach Hersteller wurden die Erstantikörper unterschiedlich verdünnt und auch verschiedene Blocking Buffer verwendet (z.B. BSA oder FCS statt Milchpulver, TBS statt PBS, verschiedene Konzentrationen an Detergenz,...).

Um den gleichen Blot mehrmals mit verschiedenen Antikörpern verwenden zu können, wurde die Membran „gestrippt“:

5 min	H ₂ O
5 min	0,2 M NaOH
5 min	H ₂ O

Der Blot wurde dann erneut geblockt und mit Antikörpern wie oben beschrieben behandelt.

4.4.2. Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation

Mit dieser Methode lassen sich aus Proteinextrakten (siehe 4.3.1.2.) bestimmte Proteine mit spezifischen Antikörpern isolieren (siehe 4.3.8.).

Über den Fc-Teil des verwendeten Immunglobulins lässt sich ein bestimmter Protein-Antikörper-Komplex an Protein G- oder A-Sepharose (Pharmacia Biotech) binden, welche durch Zentrifugation aus dem Ansatz präzipitiert werden kann. Durch Aufkochen mit Probenpuffer wird der Komplex zerstört und

die Proteine lassen sich durch SDS-PAGE und anschließendem Western Blot nachweisen (siehe 4.3.3., 4.4.1.). Zur DISC Analyse wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt:

Konfluente HaCaT/pMSG und E5 Zellen in 10 cm Durchmesser Schalen wurden nach der Behandlung direkt im Medium abgekratzt und für 5 min bei 1000 rpm (MF) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 4 ml eiskaltem PBS gewaschen, anschließend in 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm (TZ) und 4°C wurde das Pellet in 500 µl Extraktionspuffer (siehe unten) für 15 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde anschließend bei 14000 rpm (TZ) und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand bestimmt (siehe 4.3.2.). Es wurden 700 µg bzw. 800 µg der Extrakte mit 3 µg α -DR4 bzw. α -DR5 Antikörpern (HS101 und HS201, Alexis) für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 µl magnetische Protein G Microbeads (Miltenyi Biotec) zugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Protein G-gebundenen Komplexe wurden über MACS Säulen, die zuvor mit 200 µl Extraktionspuffer equilibriert wurden, in einem magnetischen Feld isoliert.

Nach 4maligem Waschen mit 200 µl des gleichen Puffers wurden 100 µl 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) zugegeben. Zur Elution der Proteine wurden zunächst 20 µl 95°C heißer 1×Probenpuffer ohne Mercaptoethanol (siehe 4.3.3.) zugegeben und für 5 min inkubiert, bevor mit zusätzlichen 50 µl eluiert wurde. Das Eluat konnte anschließend mittels 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt werden. Obwohl bei diesem Verfahren die Immunglobuline intakt bleiben, wurden im Western Blot zur Sicherheit Zweitantikörper verwendet, die spezifisch nur das Fc-Fragment des Erstantikörpers erkennen. Bei diesem handelte es sich um einen monoklonalen α -FADD Antikörper (1F7, Biozol Diagnostica).

Für die Immunpräzipitation der Fas Rezeptoren wurden 655 µg der Extrakte und 3 µg Apo-1 Antikörper verwendet und wie oben beschrieben eingesetzt. Die Fas Rezeptoren wurden im Western Blot mit dem polyklonalen C-20 α -Fas Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen.

Extraktionspuffer

30 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1%	NP-40
10%	Glycerin (99,5%)
1 mM	Natriumorthovanadat
1:40	Proteaseinhibitoren

4.4.3. FACS Analyse

Mit dieser Methode wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren Fas, DR4 und DR5 auf HaCaT/pMSG und E5 Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit warmem 0,25% EDTA/PBS für 10 min inkubiert und dann für 2 min mit Trypsin/EDTA behandelt. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette vereinzelt und 5 min bei 1000 rpm (ZZ) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml kaltem PBS resuspendiert und durch eine Spritze mit Kanüle (blau, 23 G1, Becton Dickinson) gepresst. Es wurden 10 µl als Aliquot entnommen, mit 10 µl 0,25% Trypanblau/H₂O versetzt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Pro Ansatz wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt, bei 2500 rpm (TZ) und 4°C für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl kaltem PBS mit 0,05% NaN₃ und Erstantikörper für 45 min auf Eis inkubiert (1 µg/ml α-human-CD95 IgG₁, Cymbus Biotechnology; 10 µg/ml α-DR4/5, Alexis). Danach wurde mit kaltem PBS auf ca. 1,2 ml aufgefüllt, gemischt (vortex) und bei 2500 rpm (TZ) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 100 µl kaltem PBS mit 0,05% NaN₃ und 1:100 verdünntem FITC-konjugiertem Zweitantikörper für 45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mit kaltem PBS auf ca. 1,2 ml aufgefüllt, gemischt (vortex) und bei 2500 rpm (TZ) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl kaltem PBS resuspendiert und durch eine Spritze gepresst (s.o.). Alle Ansätze wurden für Doppelbestimmungen zweimal angesetzt. Als Kontrollen dienten Zellen ohne Antikörper und Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper inkubiert worden waren. Für die Messung am FACS Gerät (FACSort, Becton Dickinson) wurden die unten angegebenen Einstellungen vorgenommen und 10000 Ereignisse analysiert. Es wurde die CELLQuest Software verwendet und im FITC Detektorfilter FL-1 gemessen.

	V	A	
FSC	E-1	6,74	Lin
SSC	331	1	Lin
FL-1	407		Log

4.4.4. Indirekte Immunfluoreszenz

Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden der Kulturschale entnommen und für die anschließende Inkubation mit Antikörpern entweder einer Aceton- oder einer Paraformaldehyd- bzw. Formaldehydfixierung unterzogen. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Leica DMRD Fluoreszenzmikroskop mit Kameraausrüstung (Leica) oder dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Leica TCS SP).

4.4.4.1. Acetonfixierung

Die auf den Deckgläsern gewachsenen Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für jeweils 5 min in Methanol und Aceton (-20°C) fixiert. Nach dem Abdampfen des Acetons wurden die fixierten Zellen bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer mit Caspase-3 Antikörper (Cell Signaling) inkubiert. Dieser wurde in PBS mit 0,5% BSA, 0,5% Tween-20 und 0,02% NaN₃ 1:50 verdünnt. Danach wurden die Zellen in PBS gewaschen und im Anschluss mit einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1:100 verdünnt) zusammen mit Propidium Iodid (0,5 mg/ml, 1:75 verdünnt) für 1 h im Dunkeln behandelt. Die Präparate wurden anschließend erneut mit PBS, und dann kurz in *a. bidest* gewaschen, um eine Anlagerung von Salzkristallen zu verhindern. Die Zellen wurden auf einem Objektträger in FluoroprepTM (bioMerieux, Marcy l'Étoile, Frankreich) eingedeckt, kurz getrocknet und zum Schutz vor weiterer Austrocknung mit Nagellack abgedichtet und bei 4°C gelagert.

4.4.4.2. Paraformaldehydfixierung

Nach dem Waschen der Deckgläser in kaltem PBS wurden diese für 20 min mit 3% Paraformaldehyd/PBS bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Präparate in kaltem PBS gewaschen, für 10 min zur Absättigung der freien Aldehydgruppen mit 50 mM NH₄Cl/PBS inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 0,2% Triton X-100/PBS permeabilisiert, wonach erneut in PBS gewaschen wurde.

Zur Darstellung des Actincytoskelettes wurden die Zellen für 30 min mit 1% BSA/PBS behandelt, bevor sie für 30 min mit Phalloidin-Alexa 568 (Molecular Probes) 1:40 verdünnt in 1% BSA/PBS im Dunkeln inkubiert wurden. Die weitere Behandlung erfolgte wie in 4.4.4.1. beschrieben.

4.4.4.3. Formaldehydfixierung

Die Zellen wurden zweimal in warmem PBS gewaschen, danach für 10 min in 3,7% Formaldehyd/PBS bei Raumtemperatur fixiert und erneut gewaschen. Anschließend wurde mit 0,1% Triton X-100/PBS für 5 min permeabilisiert und mit PBS gewaschen. Bevor der Caspase-3 Antikörper zugegeben wurde (s.o.), wurde mit 1:5 verdünntem Ziegenserum (DABCO) für 20 min inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie in 4.4.4.1. beschrieben.

5. Ergebnisse

5.1. Aktivierung der Signaltransduktion durch osmotischen Stress

Wie in der Einleitung beschrieben, wird HPV-16 E5 eine Rolle bei der Veränderung in der Signaltransduktion der transfizierten und möglicherweise auch der infizierten Zelle zugeschrieben. So ist bekannt, dass E5 die Wachstumsfaktor (EGF)-vermittelte Signaltransduktion verstärkt (Crusius et al., 1998, 2000; Pim et al., 1992; Straight et al., 1993). Da die Zellen der Haut bzw. Schleimhaut ständig vielfältigen exogenen Stresssituationen ausgesetzt sind, wurde untersucht, ob E5 die Stress-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst. Als Auslöser wurde ein osmotischer Schock gewählt, der durch eine hyperosmolare Konzentration von 0,6 M Sorbitol hervorgerufen wurde. Dies führt zu einer Reduzierung des Zellvolumens durch Wasseraustritt. Bei Sorbitol handelt es sich um einen nicht-ionisierbaren Alkoholzucker, der in der Zelle aus Glukose durch die Aldosereduktase gebildet wird und als Osmolyt dem Entzug von Wasser aus der Zelle entgegen wirkt (Lang et al., 1998). Die Verwendung von Sorbitol anstelle von z.B. NaCl bietet den Vorteil, dass die an sich schon komplexe Reaktion der Zelle nicht zusätzlich durch eine vorangehende massive Ladungsveränderung begleitet wird.

5.1.1. Nachweis der E5 mRNA Expression in HaCaT/E5 Zellen

Als experimentelles System wurden die humanen Keratinocyten Zelllinien HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 verwendet, bei denen es sich um stabile polyklonale Zelllinien handelt (Oelze et al., 1995). Das E5 Gen steht dabei unter der Kontrolle des Dexamethason-induzierbaren MMTV-Promotors; die HaCaT/pMSG Zellen enthalten kein E5 Gen und dienen damit als Referenz. HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen wurden kultiviert und in Anwesenheit von 1 μ M Dexamethason ausgehungert wie in 4.2.1.1. beschrieben. Nach RNA-Extraktion (siehe 4.1.7.) wurde die Expression von E5 mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 5.1; siehe 4.1.8., 4.1.9.).

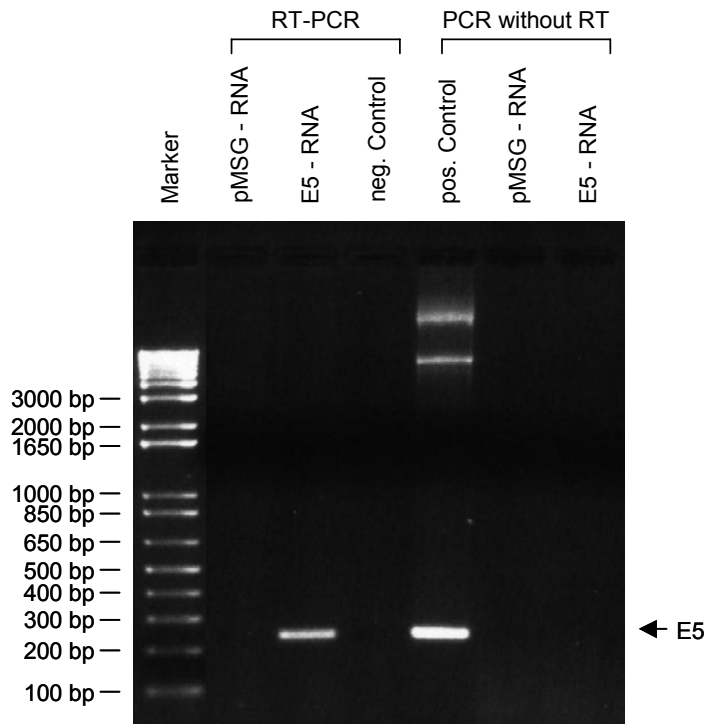


Abb. 5.1: Expression von E5 mRNA in HaCaT/E5 Zellen.

HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit 1 μ M Dexamethason behandelt wie in 4.2.1.1. beschrieben. Die gesamte RNA der Zellen wurde isoliert und mittels reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese wurde mit spezifischen E5-Primern für eine PCR eingesetzt und jeweils 10 μ l auf einem 1,7%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt (4.1.3.).

Spur 1: RT-PCR HaCaT/pMSG
 Spur 2: RT-PCR HaCaT/E5
 Spur 3: RT-PCR H₂O

Spur 4: PCR pCI-E5 Plasmid-DNA
 Spur 5: PCR von HaCaT/pMSG RNA
 Spur 6: PCR von HaCaT/E5 RNA

In den Spuren 1 und 2 des 1,7%igen TAE-Agarosegels wurden je 10 μ l der RT-PCR von HaCaT/pMSG (1) und HaCaT/E5 (2) aufgetragen; nur in den E5 Zellen erscheint eine E5-spezifische Bande von ca. 250 bp. In den Spuren 5 und 6 wurde die RNA aus HaCaT/pMSG (5) und E5 (6) direkt für die PCR eingesetzt, ohne eine vorangehende reverse Transkription in cDNA durchzuführen. Hier konnte keine E5-Bande nachgewiesen werden, was beweist, dass es sich in den Spuren 1 und 2 nicht um eine DNA-Kontamination handeln kann. Ein direkter Nachweis des E5 Proteins war nicht möglich, da es aufgrund der hydrophoben Eigenschaften dieses Membranproteins keine zuverlässigen Antikörper gibt, um E5 zu detektieren.

5.1.2. Die *in vitro* Kinaseaktivität von p38 und JNK ist nach Sorbitol-Behandlung in HaCaT/E5 Zellen reduziert.

In dem folgenden Versuch wurden HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen kultiviert und ausgehungert wie in 4.2.1.1. beschrieben, bevor die Zellen einem osmotischen Stress durch 0,6 M Sorbitol ausgesetzt wurden. Durch den damit ausgelösten Verlust von Zellvolumen werden die Stresskinasen p38 und JNK aktiviert. Es wurde daher als erstes die Aktivität dieser beiden Kinasen in einem *in vitro* Kinaseaktivitäts-Assay gemessen (Abb. 5.2; siehe 4.3.8.).

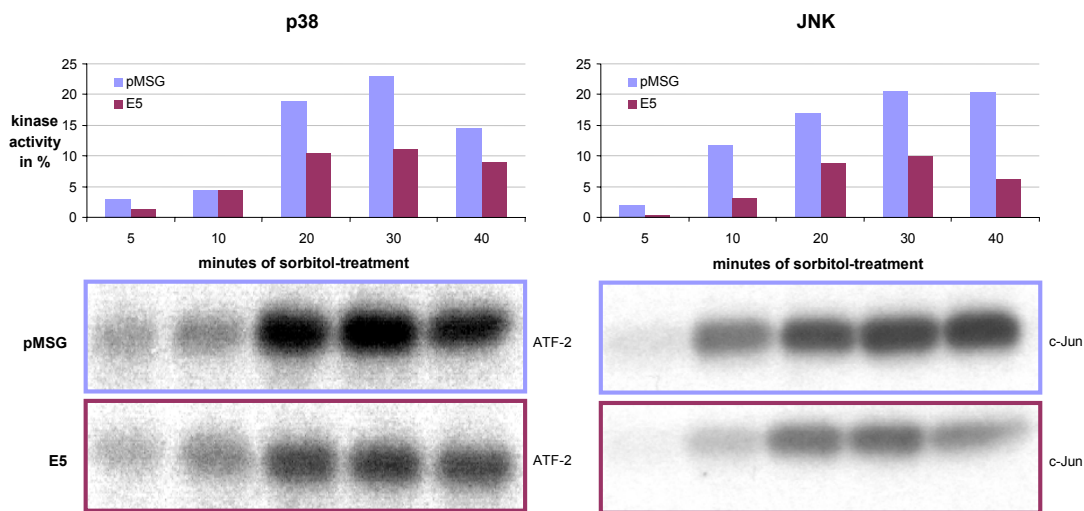


Abb. 5.2: *In vitro* Kinaseaktivität von p38 und JNK nach Sorbitol-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit Sorbitol behandelt wie im Text beschrieben. Je 500 µg der Proteinextrakte wurden mit 1,5 µg p38 bzw. JNK Antikörpern und Protein G-Sepharose präzipitiert und die Kinasereaktion mit den GST-Fusionsproteinen GST-ATF-2 für p38 und GST-cJun für JNK mit p^{32} -γ-ATP durchgeführt. Die phosphorylierten Substrate wurden mit dem Phosphorimager quantifiziert. Oben: Im Histogramm ist die Kinaseaktivität als Teil der gesamten durch Sorbitol induzierten Aktivität in HaCaT/pMSG (blau) und E5 (rot) dargestellt. Dabei wurde die Ruheaktivität von ausgehungerten, nicht mit Sorbitol behandelten Zellen als Hintergrund subtrahiert. Unten: Autoradiographie der phosphorylierten Substrate auf einem Röntgenfilm.

HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen wurden ausgehungert und für 5 min, 10 min, 20 min, 30 min und 40 min mit 0,6 M Sorbitol behandelt. Je 500 µg der Zellextrakte wurden mit 1,5 µg p38 bzw. JNK Antikörpern präzipitiert. Als Substrate für die Kinasereaktion mit p^{32} -γ-ATP wurden zuvor GST-Fusionsproteine der Transkriptionsfaktoren ATF-2 für p38 und c-Jun für JNK aufgereinigt (siehe 4.3.6.). Die phosphorylierten Substrate wurden mittels SDS-PAGE (siehe 4.3.3.) aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen. Eine Quantifizierung der Banden wurde mit dem Phosphorimager durchgeführt und die Kinaseaktivität im Histogramm (Abb. 5.2 oben) als Teil der gesamten Kinaseaktivität angegeben, die im Experiment durch Sorbitol induziert worden

war. Die Kinaseaktivität von ausgehungerten, aber nicht mit Sorbitol behandelten HaCaT/pMSG und E5 Zellen war annähernd gleich gering (nicht gezeigt) und wurde als Hintergrundaktivität von der durch Sorbitol induzierten Aktivität subtrahiert. Im Vergleich zu den HaCaT/pMSG Zellen (blau) war in HaCaT/E5 (rot) die Aktivität von p38 um den Faktor 1,5, die von JNK um den Faktor 1,9 reduziert. In beiden Zelllinien wurde die maximale Aktivierung in diesem Versuch bei einer Behandlung mit Sorbitol für 30 min erreicht, die nach 40 min bereits wieder nachließ. Im unteren Teil der Abbildung sind die Banden des radioaktiven Substrates auf einem Röntgenfilm dargestellt.

Da die beiden Kinasen über verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden können (Abb. 1.5) und bei beiden Kinasen eine durch die E5 Expression hervorgerufene Reduktion in der Kinaseaktivität festgestellt werden konnte, sollte nach einem möglichen Interaktionspartner für E5 gesucht werden, der am Beginn der beiden Kaskaden stehen müsste. Als mögliche Kandidaten wurden die kleinen G-Proteine der Rho-Familie angesehen. Es wurde daher die Aktivierung der G-Proteine Cdc42 und Rac1 mittels Affinitätspräzipitation untersucht (Abb. 5.3; siehe 4.3.7.).

5.1.3. Die Mengen an GTP-Cdc42 und GTP-Rac1 sind höher in HaCaT/E5 Zellen als in HaCaT/pMSG.

HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen wurden kultiviert und ausgehungert wie in 4.2.1.1. beschrieben, bevor die Zellen für 5 min mit 0,6 M Sorbitol oder 2,5 ng/ml EGF behandelt wurden. Je 500 µg der Zellextrakte wurden mit einem GST-Fusionsprotein präzipitiert, welches eine p21-Bindungsdomäne PBD (AS 67-150 aus humanem PAK1) enthielt, an die nur die aktivierten GTP-gebundenen Formen von Cdc42 und Rac1 binden können. Als Negativkontrolle wurden mit Sorbitol behandelte HaCaT/pMSG und E5 Zellextrakte mit GST ohne den Fusionsproteinanteil verwendet (hier nur für HaCaT/pMSG gezeigt). Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE (siehe 4.3.3.) aufgetrennt und Cdc42 und Rac1 im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe 4.4.1.).

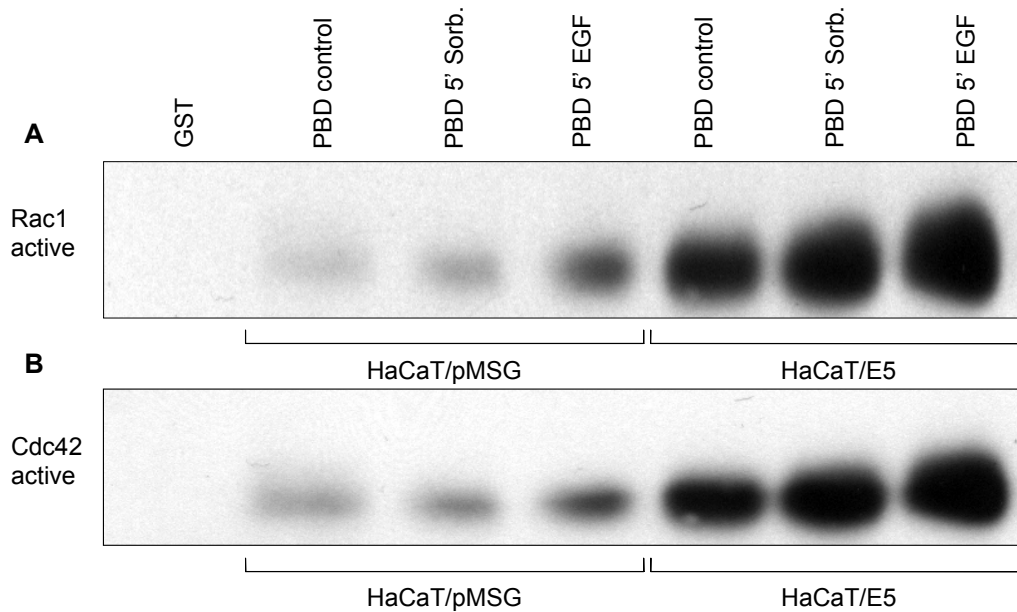


Abb. 5.3: Nachweis von GTP-Rac1 und GTP-Cdc42 in HaCaT/pMSG und E5 Zellen. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und 5 min mit Sorbitol bzw. 2,5 ng/ml EGF behandelt, bevor je 500 µg der Proteinextrakte der Zellen mit GST-PBD präzipitiert wurden. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Rac1 (A) und Cdc42 (B) im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle wurde GST ohne PBD verwendet (links). In HaCaT/E5 sind bereits bei unbehandelten Zellen (control) die Mengen an aktiviertem Rac1 und Cdc42 deutlich höher als bei HaCaT/pMSG.

Wie in Abb. 5.3 zu sehen, konnte nur GST-PBD an GTP-gebundenes Cdc42 und Rac1 binden, nicht aber GST allein. Bereits in unbehandelten (control) HaCaT/E5 Zellen war die Menge an aktiviertem Cdc42 und Rac1 deutlich erhöht im Vergleich zu den HaCaT/pMSG Zellen, und steigerte sich noch mehr nach Sorbitol- und EGF-Behandlung.

5.1.4. Cdc42 liegt in HaCaT/E5 Zellen nach Sorbitol-Behandlung stärker membranassoziiert vor als in HaCaT/pMSG.

Die Ergebnisse der Affinitätspräzipitation wurden unabhängig durch eine weitere Untersuchungsmethode bestätigt, nämlich der Membran-Cytosol Fraktionierung (siehe 4.3.4.). Es ist bekannt, dass die GTP-gebundenen Formen von Cdc42 und Rac1 membranassoziiert und die inaktiven GDP-Formen im Cytoplasma vorliegen.

In Abb. 5.4 ist die Verteilung von Cdc42 in der Membran- und Cytosolfraktion von unbehandelten (control) sowie 30 min mit 0,6 M Sorbitol behandelten HaCaT/pMSG und E5 Zellen gezeigt.

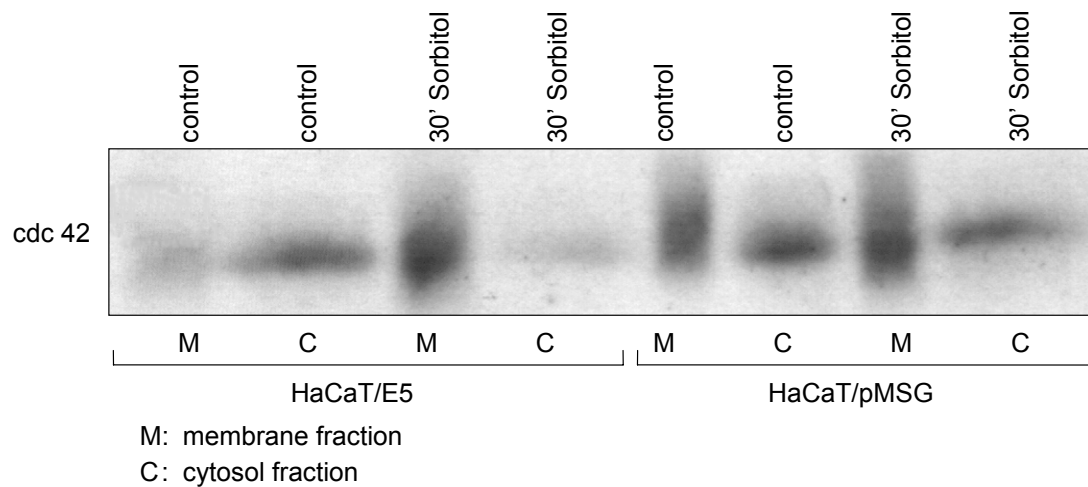


Abb. 5.4: Membranassoziation von Cdc42 in HaCaT/E5 und HaCaT/pMSG Zellen nach Sorbitol-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und 30 min mit Sorbitol behandelt. Die Zellen wurden homogenisiert und durch Zentrifugation in eine Membran- (M) und Cytosolfraction (C) unterteilt. Je 100 µg der Proteinextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Cdc42 im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Nur in HaCaT/E5 Zellen ist nach Sorbitol-Behandlung eine deutliche Verschiebung von Cdc42 in die Membranfraktion zu beobachten.

Die Zellen wurden kultiviert und in Anwesenheit von 1 µM Dexamethason ausgehungert wie in 4.2.1.1. beschrieben, bevor die Sorbitol-Behandlung durchgeführt wurde. Nachdem die Zellen mit einem Douncer-Homogenisator aufgeschlossen worden waren, wurde durch eine Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm (MF) und 4°C nicht-lysierte Zellen und Zellorganellen sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend bei $100000 \times g$ für 1 h bei 4°C zentrifugiert und damit die Membranproteine pelletiert. Der Proteingehalt des Membranpellets und der im Überstand enthaltenen cytosolischen Proteine wurde bestimmt (siehe 4.3.2.), je 100 µg mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.3.3.) und Cdc42 im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe 4.4.1.).

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es in HaCaT/E5 Zellen nach Sorbitol-Behandlung zu einer Verschiebung der Menge an Cdc42 in die Membranfraktion kam. In HaCaT/pMSG Zellen konnte keine signifikante Verschiebung aus der cytoplasmatischen Fraktion in die Membranfraktion festgestellt werden.

5.1.5. Die Inhibierung der G-Proteine durch Toxin B hat keinen negativen Effekt auf die Aktivierung von p38 und JNK nach Sorbitol-Behandlung.

Als nächstes stellte sich die Frage, wie eine stärkere Aktivierung der G-Proteine Cdc42 und Rac1 in den HaCaT/E5 Zellen (Abb. 5.3, 5.4) gleichzeitig zu einer reduzierten Aktivierung der Stresskinasen p38 und JNK führen kann (Abb. 5.2). Eine Möglichkeit wäre, dass diese Proteine negativ-regulatorisch auf die Signalkaskaden einwirken. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen mit 1 µg/ml Toxin B von *Clostridium difficile* für 2 h behandelt, bevor Sorbitol für 1 h zusammen mit Toxin B zugegeben wurde (Abb. 5.5).

Es handelt sich dabei um ein Exotoxin, das in der Lage ist, die kleinen G-Proteine Cdc42 und Rac1 an Threonin 35 sowie Rho an Threonin 37 zu glykosylieren und damit zu inaktivieren (Boquet et al., 1998). Als Substrat dient dabei UDP-Glukose, deren Glukoseanteil auf das Threonin der GTPase übertragen wird. Aufgrund der sterischen Behinderung durch die modifizierte Aminosäure in der GTPase Effektor-domäne können die aktivierten G-Proteine nun nicht mehr an ihre Partnerkinasen wie z. B. PAK1 binden und diese aktivieren. Der zelluläre Rezeptor für Toxin B konnte bisher noch nicht identifiziert werden, ist aber in HaCaT Zellen vorhanden.

In Abb. 5.5 sind im Western Blot die phosphorylierten p38 und JNK Kinasen gezeigt.

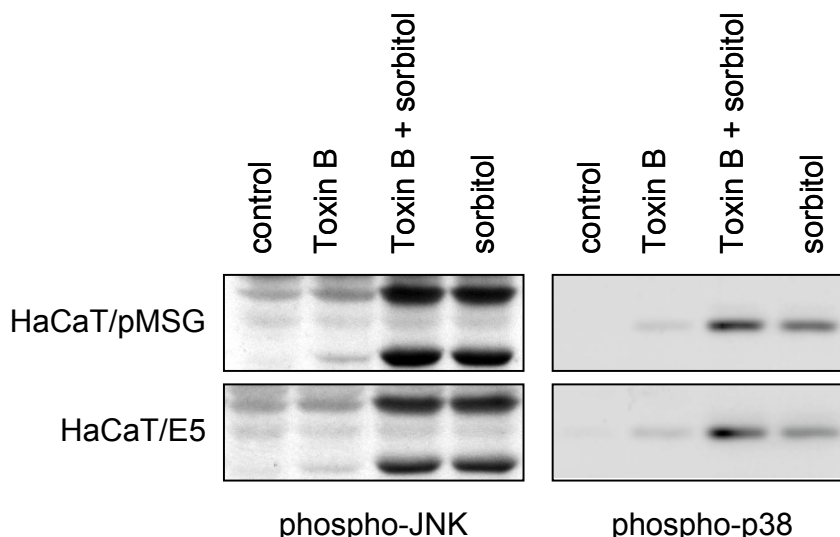


Abb. 5.5: Auswirkung der Inhibierung der G-Proteine durch Toxin B auf die Aktivierung von p38 und JNK nach Sorbitol-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und 2 h mit 1 µg/ml Toxin B behandelt, bevor Sorbitol für 1 weitere Stunde zu dem Inhibitor zugegeben wurde. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und aktivierte p38 und JNK im Western Blot mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Toxin B Behandlung allein führt bereits zu einer Aktivierung von p38.

Wie deutlich zu sehen ist, hat die Behandlung mit Toxin B keinen negativen Effekt auf die Aktivierung der Kinasen durch Sorbitol. Im Gegenteil, zumindest bei p38 kann auch ohne Sorbitol durch die Behandlung mit Toxin B allein, eine Aktivierung der Kinase ausgelöst werden. Dies kann so gedeutet werden, dass die kleinen G-Proteine der Rho-Familie negativ auf die Signalkaskade einwirken, die zur Aktivierung der Stresskinasen p38 und JNK führt.

Wie kommt es aber zu einer erhöhten Menge an aktivierten Cdc42 und Rac1 Proteinen in HaCaT/E5 Zellen? Möglicherweise gibt es eine direkte Interaktion zwischen dem E5 Protein und Cdc42 bzw. Rac1. Um diese Frage zu beantworten, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

5.1.6. Untersuchungen zur direkten Interaktion zwischen HPV-16 E5 und den G-Proteinen Rac1 bzw. Cdc42

Da es keine Antikörper gibt, mit denen sich das E5 Protein nachweisen lässt, wurden verschiedene Epitop-tragende E5 Proteine (N-terminal: Hämagglutinin HA, FLAG, und „Green Fluorescent Protein“ GFP) verwendet. Da sich HaCaT Zellen nur sehr schlecht transfizieren lassen, wurden Cos7 Zellen (siehe 3.2., 4.2.1.3.) transient mit dem Transfektionsreagenz FuGENE™ 6 (Roche) und der DNA für jeweils eines der verschiedenen E5 Proteine transfiziert (siehe 4.2.2.1.).

In Co-Immunpräzipitationen mit Cdc42 oder Rac1 Antikörpern wurden dann die verschiedenen E5 Proteine im Western Blot mit HA-, FLAG- oder GFP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (nicht gezeigt). Allerdings ließen sich die verschiedenen E5 Proteine auch unspezifisch mit Serum aus nicht-immunisierten Kaninchen präzipitieren. Wurde im Anschluss an eine solche Fällung mit Cdc42 oder Rac1 Antikörpern präzipitiert, konnte nun kein E5 mehr nachgewiesen werden.

Bei einer Präzipitation mit Protein G-Sepharose ohne Zugabe von Antikörpern konnte kein E5 im Western Blot detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass E5 aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften unspezifisch an Immunglobuline (monoklonale und polyklonale) aber nicht an Protein G-Sepharose binden kann.

Da diese Experimente keinen Schluss auf die Frage nach einer Interaktion zwischen E5 und Cdc42 bzw. Rac1 zuließen, wurde in einem weiteren Versuch die Verteilung von GFP-E5 und Rac1 bzw. Cdc42 in Cos7 Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (siehe 4.4.4.). Da GFP-E5 bei Anregung durch 395nm grünes Licht abstrahlt (509-540nm), wurden Rac1 bzw. Cdc42 Antikörper zusammen mit einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper verwendet, der rot fluoresziert (nicht gezeigt). Auch mit diesem Versuch konnte keine eindeutige Co-Lokalisation zwischen GFP-E5 und den G-Proteinen Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden, da nur in einigen Bereichen wie z. B. der Plasmamembran beide Signale gefunden wurden, in anderen (z. B. in der Kernmembran) dagegen nicht.

In einem dritten Ansatz wurde in einem Overlay-Assay (siehe 4.3.9.) untersucht, ob p^{32} - γ -GTP beladenes Rac1 bzw. Cdc42 als radioaktiv markierte Sonde in der Lage ist, mit auf PVDF Membran geblottetem E5 Protein zu interagieren (Abb. 5.6).

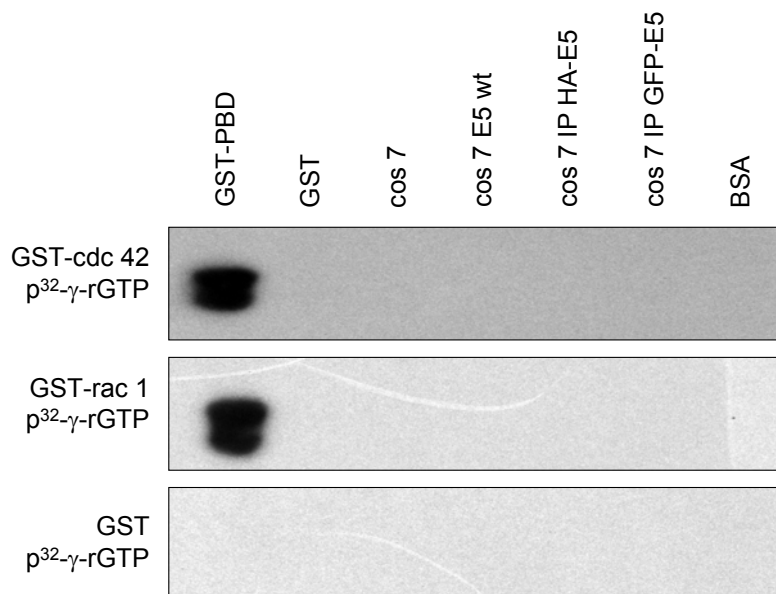


Abb. 5.6: Interaktion von p^{32} - γ -GTP GST-Cdc42 sowie GST-Rac1 mit dem E5 Protein. Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membran geblottet. Diese wurde dann mit den radioaktiv markierten Sonden GST, GST-Rac1 oder GST-Cdc42 inkubiert. Die Bindung der radioaktiven Sonden wurde durch einen Röntgenfilm dargestellt.

Spur 1: 10 μ g GST-PBD

Spur 2: 10 μ g GST

Spur 3: 290 μ g Cos7 Zelleextrakt

Spur 4: 290 μ g Cos7 Zelleextrakt transfiziert mit E5 Wildtyp DNA

Spur 5: 900 μ g Cos7 Zelleextrakt transfiziert mit E5-HA und präzipitiert mit HA Antikörpern

Spur 6: 900 μ g Cos7 Zelleextrakt transfiziert mit GFP-E5 und präzipitiert mit GFP Antikörpern

Spur 7: 100 μ g BSA

Dazu musste zunächst das Gen für Cdc42 aus dem Vektor pcDNA3 mit *BamHI* und *EcoRI* in den Vektor pGEX-2T umkloniert werden (siehe 4.1.2.-4.1.6.; nicht gezeigt), da nur Rac1 bereits in diesem Vektor vorlag. Nach erfolgreicher Klonierung wurden BL21 Bakterien transformiert und dann GST allein sowie die GST-Fusionsproteine GST-Rac1, GST-Cdc42 und GST-PBD aus diesen aufgereinigt (siehe 4.3.6.). Als Sonden wurden GST-Rac1, GST-Cdc42 und GST mit Glutathion gespalten und in einer GDP-GTP Austauschreaktion mit p^{32} - γ -GTP beladen.

Jede dieser Sonden wurde zusammen mit einem Filter inkubiert, auf den unter anderem verschiedene E5 Proteine geblottet worden waren. Nachdem die nicht gebundenen Sonden gewaschen worden waren, wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Nur in der Positivkontrolle, bei der es sich um 10 μ g GST-PBD handelte, konnte eine Bindung mit den GST-Rac1 und GST-Cdc42 Sonden nachgewiesen werden, nicht aber mit GST allein. Eine direkte Bindung von Rac1 und Cdc42 an E5 konnte also auch mit diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. In Anbetracht der verschiedenen Experimente erscheint eine direkte Interaktion letztendlich unwahrscheinlich.

5.1.7. HaCaT/pMSG und E5 Zellen zeigen Unterschiede in der Actin-Cytoskelettstruktur nach Sorbitol-Behandlung.

Als nächstes stellte sich die Frage, welche Bedeutung die stärkere Aktivierung von Cdc42 und Rac1 in HaCaT/E5 für die Zellen hat. Da bekannt ist, dass die kleinen G-Proteine eine Rolle bei der Regulation der Cytoskelettstruktur spielen (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997), sollte diese untersucht werden.

Dazu wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen auf Deckgläschen kultiviert, in Anwesenheit von Dexamethason ausgehungert wie in 4.2.1.1. beschrieben und für 30 min mit 0,6 M Sorbitol behandelt. Danach wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd fixiert (siehe 4.4.4.3.) und das Actin-Cytoskelett mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt (Abb. 5.7). Dieses Phalloidin stammt aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* und ist in der Lage an F-Actin zu binden, wobei die Actinpolymerisation 30-fach erhöht und F-Actin stabilisiert wird.

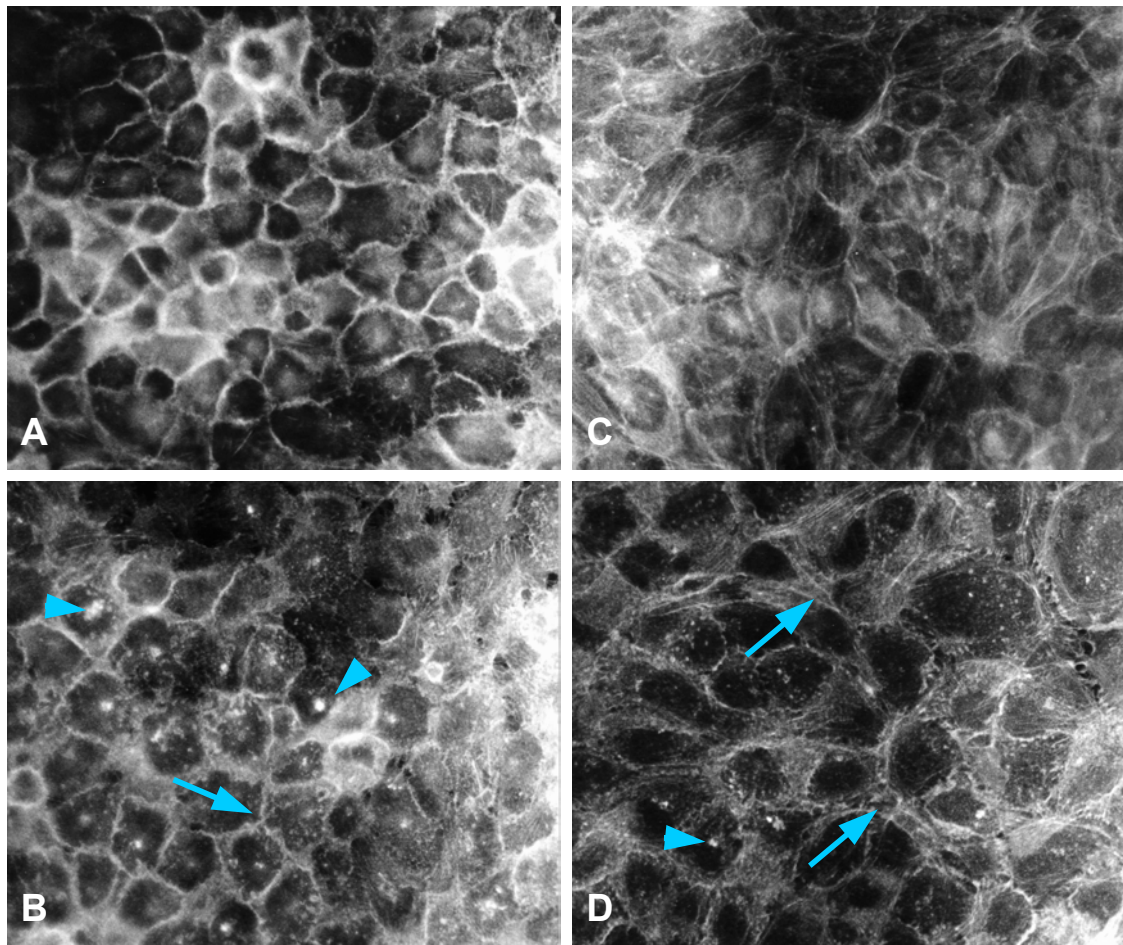


Abb. 5.7: Veränderungen in der Actin-Cytoskelettstruktur in HaCaT/pMSG und E5 Zellen nach Sorbitol-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und 30 min mit Sorbitol behandelt, in Formaldehyd fixiert und die Verteilung von F-Actin mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin im Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

- A** unbehandelte HaCaT/pMSG: Die meiste Fluoreszenz ist an den basolateralen Membranen lokalisiert. Es sind nur wenige Stress-Fasern vorhanden.
- B** Sorbitol-behandelte HaCaT/pMSG: In den Zellen ist eine erhöhte Menge an „membrane ruffles“ (siehe Pfeil) angefärbt. Ein großer Teil des Actins ist in punktförmigen Strukturen (siehe Pfeilspitzen) im Cytoplasma zu finden.
- C** unbehandelte HaCaT/E5: Die meiste Fluoreszenz erscheint in den Stress-Fasern und nur wenig gefärbtes Actin ist an den basolateralen Membranen lokalisiert.
- D** Sorbitol-behandelte HaCaT/E5: Die Zellen zeigen immer noch Stress-Fasern, die sich hauptsächlich an der Plasmamembran entlang ziehen (siehe Pfeile). Ähnlich wie bei B nimmt der Anteil an punktförmigen Strukturen (siehe Pfeilspitze) im Cytoplasma zu.

Wie in Abb. 5.7 zu sehen, ließen sich zwischen HaCaT/pMSG und E5 Zellen sowohl im unbehandelten Zustand, als auch nach Sorbitol-Behandlung Unterschiede in der Actin-Organisation feststellen. In unbehandelten HaCaT/pMSG Zellen war die meiste Fluoreszenz an den basolateralen Membranen lokalisiert, und nur wenige Stress-Fasern waren vorhanden (Abb. 5.7A). Bei den Stress-Fasern handelt es sich um gebündelte Actinfilamente, welche die Zelle durchspannen und sie über die Fokaladhäsionen mit der extrazellulären Matrix verbinden (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997).

In den unbehandelten HaCaT/E5 Zellen war die Anzahl an Stress-Fasern deutlich größer als in den unbehandelten HaCaT/pMSG Zellen und nur wenig Fluoreszenz wurde an den basolateralen Membranen gefunden (Abb. 5.7C). Nach Sorbitol-Behandlung wiesen die HaCaT/pMSG Zellen eine erhöhte Menge an „membrane ruffles“ und punktförmigen Actinstrukturen im Cytoplasma auf (Abb. 5.7B). Bei „membrane ruffles“ handelt es sich um Lamellipodia, die sich vom Untergrund abgelöst haben und zurückgefaltet sind (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). In den Sorbitol-behandelten HaCaT/E5 Zellen zeigten sich dagegen immer noch Stress-Fasern, die sich an den Rändern der Plasmamembran entlangzogen (Abb. 5.7D, Pfeil). Ähnlich wie bei den HaCaT/pMSG Zellen nahm die Menge an punktförmigen Actinstrukturen im Cytoplasma zu, wenngleich auch weniger ausgeprägt.

Es erscheint einleuchtend, dass Veränderungen in der Cytoskelettstruktur einen tiefgreifenden Einfluss auf verschiedene zelluläre Ereignisse wie das „membrane trafficking“ (z. B. Sekretion, Endo- und Exocytose, Phagocytose oder Antigen-Präsentation), die transkriptionelle Regulation (durch Aktivierung der MAP Kinasen) und damit auf das Zellwachstum und die Entwicklung haben. Eine durch HPV-16 E5 vermittelte Umstrukturierung bzw. Zerstörung des Actin-Cytoskeletts und eine vermutlich daraus resultierende Inhibierung des Transports von endocytisierten Vesikeln wurde bereits für C127 Mausfibroblasten beschrieben (Thomsen et al., 2000). Daher ist es gut möglich, dass die beobachteten vielseitigen Veränderungen in der Signaltransduktion E5-exprimierender Zellen indirekt auf einer Neuordnung des Actin-Cytoskeletts beruhen.

5.2. Durch osmotischen Stress induzierte Apoptose

5.2.1. Aktivierung von Caspase-3 nach Sorbitol-Behandlung

Nachdem eine Wirkung von HPV-16 E5 auf die Stress-vermittelte Signaltransduktion beobachtet werden konnte, stellte sich nun die Frage nach der physiologischen Bedeutung für die Zelle. Eine signifikante Veränderung der Proliferation gemessen an der Cyclin A Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz von unbehandelten und Sorbitol-behandelten HaCaT/pMSG und E5 Zellen konnte nicht festgestellt werden, sowohl in Bezug auf die Behandlung als auch zwischen den beiden Zelllinien (nicht gezeigt). Da beschrieben worden war, dass die Aktivierung der Stresskinase p38 in Verbindung zur Apoptose steht (Ono und Han, 2000), wurde untersucht, ob E5 die Apoptose beeinflussen kann.

Dazu wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen kultiviert und in Anwesenheit von 1 µM Dexamethason ausgehungert wie in 4.2.1.1. beschrieben, bevor Apoptose durch osmotischen Stress ausgelöst wurde. Die Zellen wurden für 30 min mit 0,6 M Sorbitol behandelt, mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min, 1 h, 2 h und 4 h mit Kulturmedium ohne FCS weiterkultiviert. Die Induktion der Apoptose wurde durch den Nachweis von gespaltener d.h. aktivierter Procaspase-3 gemessen. Diese zentrale Caspase kann sowohl durch den extrinsischen d.h. über die Todesrezeptoren als auch durch den intrinsischen mitochondrialen Weg aktiviert werden und wird als sog. „point of no return“ betrachtet. Wird diese Caspase aktiviert, kann das Apoptoseprogramm nicht mehr abgebrochen werden.

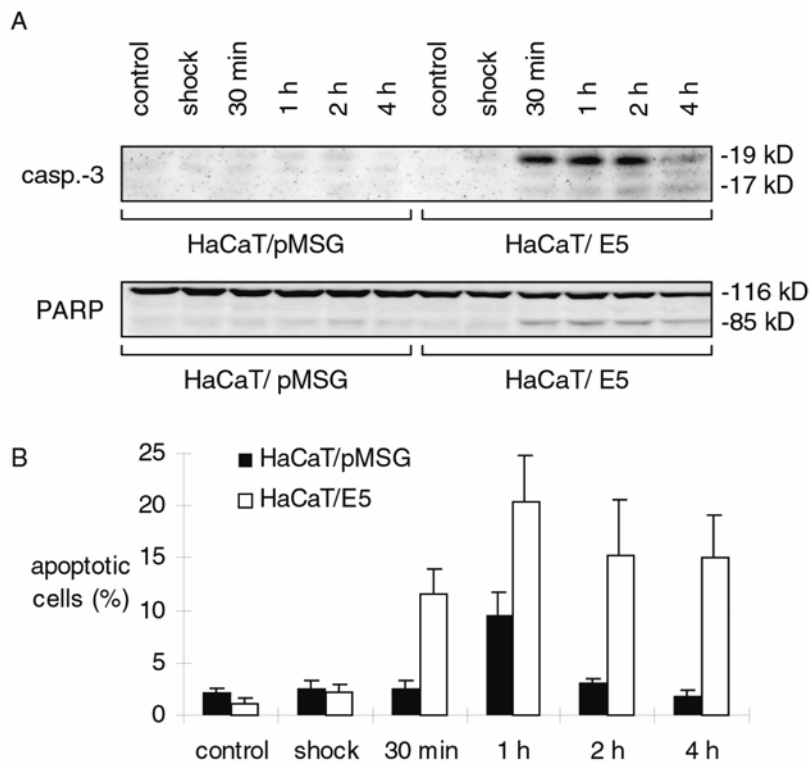


Abb. 5.8: Aktivierung von Caspase-3 nach Sorbitol-Behandlung.

- A** HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit einem Sorbitolschock behandelt wie im Text beschrieben. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Spaltung von Procaspase-3 und PARP im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In HaCaT/E5 begann die Aktivierung von Caspase-3 und die Spaltung des Substrates PARP 30 min nach dem Schock. Nach 4 h war die Spaltung von Caspase-3 reduziert.
- B** HaCaT/pMSG und E5 wurden wie in 5.8A behandelt und aktivierte Caspase-3 mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das Histogramm zeigt den Prozentsatz an apoptotischen Zellen. Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus 4 Messungen. Für die Fehlerschätzung wurde der Student's t-Test mit 3 Freiheitsgraden verwendet. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem das wahre Populationsmittel mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% gefunden wird.

In Abbildung 5.8 ist die Aktivierung von Caspase-3 dargestellt. Im oberen Teil von Abb. 5.8A sind die 19 und 17 kD großen Fragmente von Caspase-3, im unteren die Spaltung eines der Substrate von Caspase-3 im Western Blot gezeigt. 30 min nach der Sorbitolschock-Behandlung konnte in HaCaT/E5 Zellen eine Spaltung von Procaspase-3 beobachtet werden, die bis 2 h nach der Behandlung konstant blieb und nach 4 h deutlich nachließ. Einen Beweis für die katalytische Kompetenz von aktivierter Caspase-3 liefert die Spaltung des Substrates Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in das 85 kD große Fragment (Abb. 5.8A, unten). Die Spaltung dieses DNA Reparaturenzyms geht mit dessen Inaktivierung einher und stellt einen weiteren Schritt in der Apoptose dar. Die Spaltung von PARP trat gleichzeitig mit der Aktivierung von Caspase-3

auf und ließ sich nur in HaCaT/E5 Zellen nachweisen. In HaCaT/pMSG Zellen konnte weder Procaspase-3 noch PARP Spaltung beobachtet werden.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, bei der ein Antikörper verwendet wurde, der spezifisch nur die aktivierte Form von Caspase-3 erkennt. In Abb. 5.8B ist die Quantifizierung dieser Immunfluoreszenz als Histogramm gezeigt. Die Menge an apoptotischen Zellen war in HaCaT/E5 (weiß dargestellt) nach Sorbitol-Behandlung signifikant um mehr als einen Faktor 2 erhöht im Vergleich zu den HaCaT/pMSG (schwarz). Die Zahl der Caspase-3 positiven Zellen in unbehandelten (control) HaCaT/pMSG und E5 war dagegen annähernd gleich niedrig.

5.2.2. Verschiedene Apoptose Stadien in HaCaT/pMSG und E5 Zellen mit aktivierter Caspase-3

In Abbildung 5.9 ist das morphologische Erscheinungsbild der Caspase-3 positiven Zellen in verschiedenen Stadien der Apoptose am Beispiel von HaCaT/pMSG gezeigt. Diese waren auch für die HaCaT/E5 Zellen repräsentativ, da sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien ausmachen ließen.

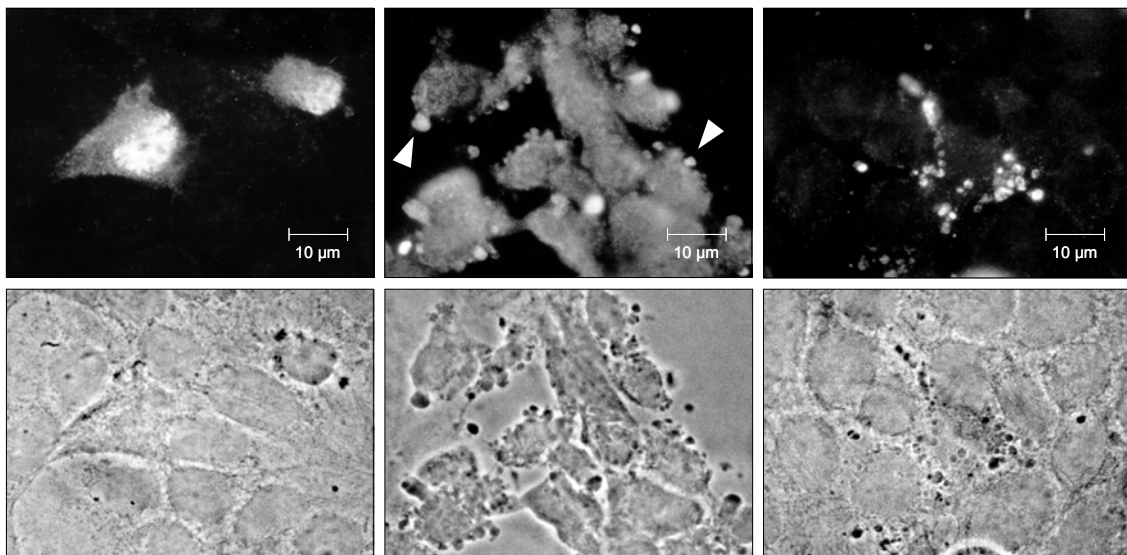


Abb. 5.9: Morphologisches Erscheinungsbild apoptotischer, Caspase-3 positiver HaCaT Zellen nach Sorbitol-Behandlung. Die Verteilung aktivierter Caspase-3 ist mittels indirekter Immunfluoreszenz im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Zum Vergleich ist unten dasselbe Zellareal im Phasenkontrast gezeigt. Im linken Bilderpaar ist ein frühes Stadium der Apoptose dargestellt, bei dem aktivierte Caspase-3 hauptsächlich im Kern der apoptotischen Zellen zu finden ist. In der Mitte sind mehrere Zellen abgebildet, die das „membrane blebbing“ (siehe Pfeilspitzen) aufweisen, typisch für ein eher fortgeschrittenes Stadium der Apoptose. Das rechte Bild zeigt sog. „apoptotic bodies“, bei denen es sich um übriggebliebene Vesikel handelt, die nach einem vollständigen Zusammenbruch der apoptotischen Zelle entstehen.

Die Verteilung von aktivierter Caspase-3 in der apoptotischen Zelle ist durch indirekte Immunfluoreszenz oben, derselbe Bildausschnitt im Phasenkontrast unten gezeigt. Die beiden linken Bilder stellen ein frühes Stadium der Apoptose dar, bei dem die Kondensation des Chromatins gut sichtbar ist. Die Zellen im mittleren Bild zeigen ein fortgeschrittenes Stadium der Apoptose mit dem typischen „membrane blebbing“. Im rechten Bild sind „apoptotic bodies“ als Überbleibsel der apoptotischen Zellen zwischen den intakten Zellen zu sehen.

Unter den wie in Abb. 5.8 gewählten Bedingungen ist Apoptose in HaCaT/pMSG Zellen ein seltenes Ereignis, dass sich nur für einzelne Zellen nachweisen lässt. Die Menge an apoptotischen Zellen reicht nicht aus, um Procaspase-3 und PARP Spaltung im Western Blot darzustellen (Abb. 5.8A).

5.2.3. Osmotischer Schock durch Sorbitol-Behandlung führt zur Aktivierung der intrinsischen Apoptose.

Nachdem gezeigt wurde, dass Apoptose 30 min nach der Sorbitol-Behandlung nur in HaCaT/E5 Zellen auftrat (Abb. 5.8A), sollte geklärt werden, über welchen Weg Apoptose ausgelöst wurde.

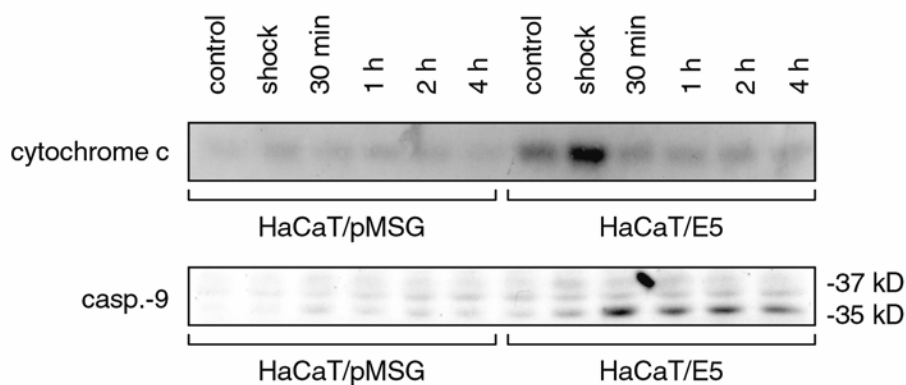


Abb. 5.10: Cytochrom c-Freisetzung nach Sorbitol-Behandlung führt zur Aktivierung von Caspase-9. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit einem Sorbitolschock behandelt wie im Text beschrieben. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und freigesetztes Cytochrom c sowie gespaltene Procaspase-9 im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In HaCaT/E5 Zellen wird Cytochrom c sofort nach Zugabe von Sorbitol ins Cytoplasma freigesetzt. Die Spaltung von Procaspase-9 beginnt in HaCaT/E5 30 min nach dem Schock. Dagegen ist in HaCaT/pMSG weder eine signifikante Cytochrom c-Freisetzung noch Caspase-9 Aktivierung nachweisbar.

Einen Hinweis auf den mitochondrialen Weg stellt die Freisetzung von Cytochrom c (siehe 4.3.5.) und die Procaspase-9 Spaltung dar (Abb. 5.10). In HaCaT/E5 Zellen ließ sich nach dem 30minütigen Sorbitolschock eine sofortige Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytoplasma

feststellen. 30 min nach dem osmotischen Schock konnte kein cytoplasmatisches Cytochrom c mehr nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund des Einbaus in das Apoptosom. In HaCaT/pMSG konnte keine Cytochrom c-Freisetzung beobachtet werden; der geringe Anteil an cytoplasmatischem Cytochrom c in unbehandelten HaCaT/E5 Zellen war sogar höher als in den Sorbitol-behandelten HaCaT/pMSG. Die Spaltung von Procaspase-9 in die 35 und 37 kD Fragmente trat in HaCaT/E5 30 min nach dem Sorbitolschock auf und nahm auch 4 h nach der Behandlung nicht ab. In HaCaT/pMSG konnte keine Spaltung von Procaspase-9 beobachtet werden; unter den gewählten Stressbedingungen konnte Sorbitol also nur in den HaCaT/E5 Zellen Apoptose über den mitochondrialen Weg auslösen.

5.2.4. Durch Sorbitol-Behandlung aktivierte Stresskinase p38 wird in HaCaT/E5 Zellen nur langsam dephosphoryliert.

Es stellte sich nun die Frage, durch welchen Mechanismus es zu der Cytochrom c-Freisetzung kommt. Für UV-behandelte HaCaT Zellen war bereits beschrieben worden, dass die Freisetzung von Cytochrom c über einen p38-abhängigen Mechanismus erfolgt (Shimizu et al., 1999; Assefa et al., 2000).

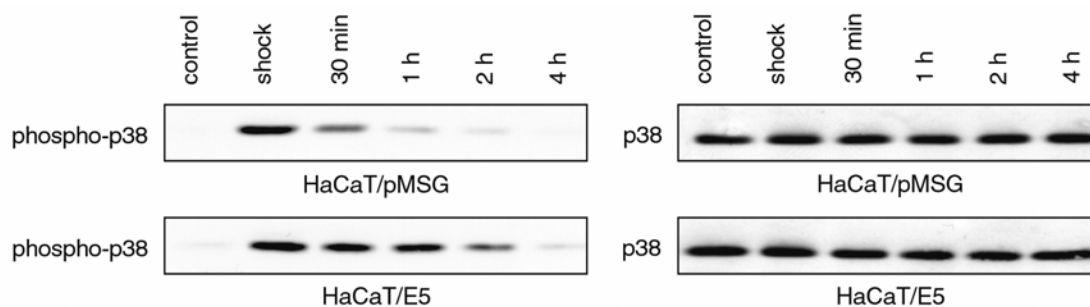


Abb. 5.11: (De)phosphorylierung der aktivierten Stresskinase p38 nach Sorbitol-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit einem Sorbitolschock behandelt wie im Text beschrieben. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und aktivierte p38 Kinase im Western Blot mit Antikörpern, die spezifisch nur die phosphorylierte Form erkennen, nachgewiesen. In HaCaT/E5 bleibt p38 länger im aktivierten Zustand als in HaCaT/pMSG. Als Kontrolle wurde die Membran gestrippt und die Gesamtmenge an p38 detektiert.

In Abb. 5.11 ist die Aktivierung von p38 nach Sorbitol-Behandlung im Western Blot (siehe 4.4.1.) mittels eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers für p38 dargestellt. In beiden Zelllinien führte der 30minütige Sorbitolschock zu einer sofortigen Aktivierung von p38. In HaCaT/E5 verblieb p38 mit bis zu 2 h nach dem Schock jedoch deutlich länger im aktivierten d.h. phosphorylierten

Zustand, wohingegen p38 in den HaCaT/pMSG bereits 30 min nach dem Schock wieder inaktiviert wurde. Die länger andauernde Aktivierung der Stresskinase p38 ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die Anwesenheit von E5 in der Zelle die Erholung von Stress verzögert. Ein Vergleich der Aktivierung und Deaktivierung der Stresskinase JNK zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien (nicht gezeigt).

5.2.5. Inhibierung von p38 durch SB 203580 verhindert die Sorbitol-induzierte Cytochrom c-Freisetzung.

Durch Inhibierung von p38 durch SB 203580 konnte eine deutliche Reduzierung der Cytochrom c-Freisetzung in HaCaT/E5 Zellen erreicht werden (Abb. 5.12). Bei SB 203580 handelt es sich um einen synthetischen Inhibitor, der in die ATP-Bindungstasche der ubiquitär exprimierten p38 α und β Isoformen bindet und somit spezifisch deren enzymatische Aktivität hemmt (Ono und Han, 2000).

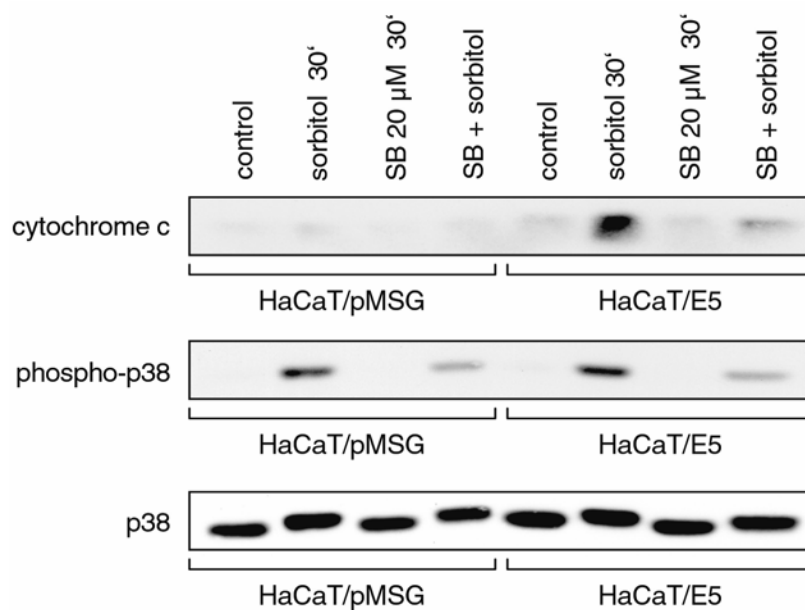


Abb. 5.12: Verhinderung der Sorbitol-induzierten Cytochrom c-Freisetzung von p38 durch SB 203580. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und 30 min mit Sorbitol behandelt. Die Aktivierung von p38 wurde durch 20 μ M SB 203580 für 30 min inhibiert, bevor Sorbitol für 30 min zu dem Inhibitor zugegeben wurde. Je 50 μ g der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und freigesetztes Cytochrom c, phosphorylierte p38 Kinase und die Gesamtmenge an p38 mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. In HaCaT/E5 ist die Cytochrom c-Freisetzung durch die Inhibierung von p38 deutlich reduziert.

Hierzu wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen für 30 min mit 20 μ M des Inhibitors SB 203580 behandelt, bevor Sorbitol für weitere 30 min zu dem Inhibitor zugegeben wurde. Die deutliche Reduktion von cytoplasmatischem Cytochrom

c in HaCaT/E5 deutet darauf hin, dass p38 in der Signalkaskade oberhalb der Cytochrom c-Freisetzung einwirkt. Möglicherweise vermag die aktivierte p38 Kinase, das Tumorsuppressorprotein p53 zu phosphorylieren, wodurch dessen transkriptionelle Aktivität erhöht wird. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax, was zur Freisetzung von Cytochrom c führen könnte. Dieser Mechanismus wurde von Assefa et al. (2000) vorgeschlagen, hier aber nicht näher untersucht.

5.2.6. Inhibierung von p38 durch SB 203580 reduziert nicht die Sorbitol-induzierte Procaspase-3 Spaltung.

Obwohl die Inhibierung von p38 zu einer Reduktion der Cytochrom c-Freisetzung in HaCaT/E5 Zellen führte (Abb. 5.12), konnte keine Reduktion in der Procaspase-3 Spaltung festgestellt werden (Abb. 5.13).

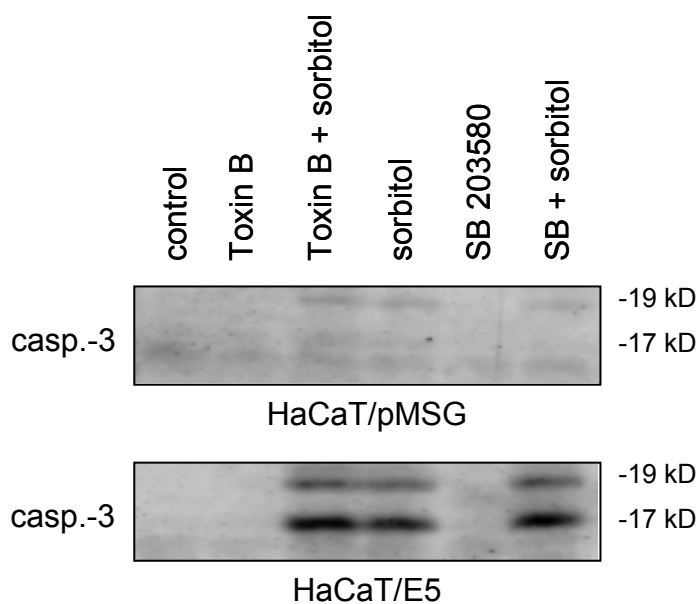


Abb. 5.13: Auswirkung der Inhibierung von p38 durch SB 203580 auf die Sorbitol-induzierte Procaspase-3 Spaltung. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und 1 h mit Sorbitol behandelt. Die Aktivierung von p38 wurde durch 20 μ M SB 203580 für 20 min inhibiert, bevor Sorbitol für 1 h zu dem Inhibitor zugegeben wurde. Als weiterer Versuch wurden die kleinen G-Proteine für 2 h mit Toxin B gehemmt, bevor ebenfalls Sorbitol für 1 h zu dem Inhibitor zugegeben wurde. Je 50 μ g der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltene Procaspase-3 im Western Blot nachgewiesen. Nur in HaCaT/E5 Zellen lässt sich aktivierte Caspase-3 feststellen. Sowohl die Inhibierung von p38 als auch der G-Proteine scheint keine signifikante Wirkung auf die Spaltung von Procaspase-3 zu haben.

Bei diesem Versuch wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen für 20 min mit 20 μ M SB 203580 behandelt, bevor Sorbitol für eine Stunde zu dem Inhibitor zugegeben wurde. Gespaltene Procaspase-3 ließ sich in HaCaT/E5 Zellen im

Western Blot auch bei Zugabe des Inhibitors nachweisen. Parallel zu diesem Versuch wurden die Zellen für 2 h mit 1 µg/ml Toxin B behandelt, bevor Sorbitol für 1 h zugegeben wurde. Da bereits festgestellt worden war, dass die Inhibierung der kleinen G-Proteine keinen negativen Effekt auf die Aktivierung von p38 hatte (Abb. 5.5), war nicht zu erwarten, dass die Caspase-3 Spaltung beeinflusst wird. Wie in Abbildung 5.13 zu sehen ist, wurde diese Annahme bestätigt.

Obwohl die Bedingungen nicht identisch zu dem Cytochrom c-Versuch (siehe 5.2.5.) gewählt wurden, da die Caspase-3 Aktivierung immer erst 30 min nach dem Schock nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.8), deuteten diese Ergebnisse daraufhin, dass Caspase-3 zusätzlich über einen zweiten von den Mitochondrien unabhängigen Weg aktiviert wurde.

5.2.7. Osmotischer Schock durch Sorbitol-Behandlung führt zur Aktivierung der extrinsischen Apoptose.

Um zu untersuchen, ob durch Sorbitol auch der extrinsische über die Todesrezeptoren vermittelte Weg ausgelöst werden kann, wurde die Spaltung der Initiator Caspase-8 analysiert.

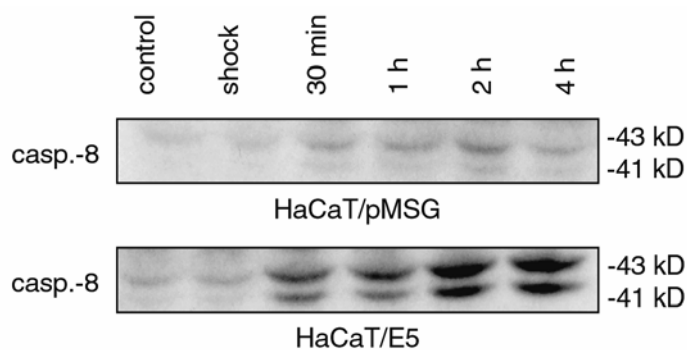


Abb. 5.14: Aktivierung von Caspase-8 nach Sorbitol-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit einem Sorbitolschock behandelt wie im Text beschrieben. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltene Procaspase-8 im Western Blot nachgewiesen. In HaCaT/E5 lässt sich eine deutlich höhere Menge an gespaltener Procaspase-8 im Vergleich zu HaCaT/pMSG feststellen.

Tatsächlich konnte in HaCaT/E5 Zellen eine Spaltung von Procaspase-8 in die 41 und 43 kD Fragmente im Western Blot gezeigt werden (Abb. 5.14). Die Spaltung begann 30 min nach dem Sorbitolschock, nahm für 2 h zu und blieb dann bis zum Ende des Experiments konstant. In HaCaT/pMSG Zellen konnte keine Aktivierung von Caspase-8 nachgewiesen werden.

Eine Ligand-unabhängige Aktivierung von Todesrezeptoren durch un-spezifischen Stress wurde in der Tat auch für UV-behandelte HaCaT Zellen berichtet (Aragane et al., 1998).

Außerdem wurde beschrieben, dass HPV-16 E5 in der Lage ist, primäre humane Vorhautkeratinocyten vor UV-vermittelter Apoptose zu schützen, indem die Aktivierung des EGFR erhöht wird (Zhang et al., 2002).

5.2.8. Die Sorbitol-induzierte Aktivierung des EGFR beeinflusst nicht die Apoptose.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des EGFR durch Sorbitol einen Einfluss auf die Apoptose hat, wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen für 1 h mit 20 bzw. 50 μ M Tyrphostin AG 1478 (in DMSO gelöst und in Kulturmedium ohne FCS verdünnt) behandelt, bevor Sorbitol für 1 h zu dem Inhibitor zugegeben wurde (Abb. 5.15; Spuren 6 und 8).

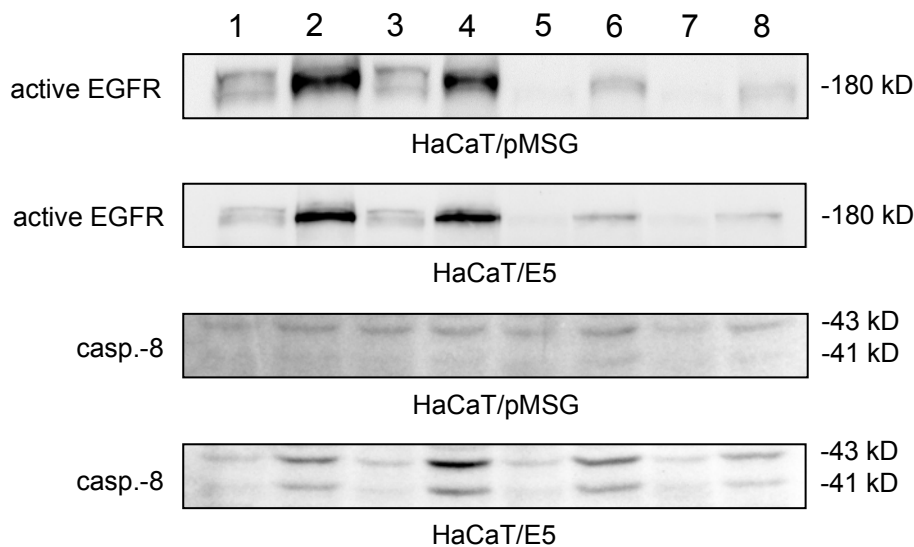


Abb. 5.15: Sorbitol-induzierte Aktivierung von EGFR und Caspase-8 nach Inhibierung mit Tyrphostin AG 1478. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit Sorbitol für 1 h behandelt (Spur 2). Die Phosphorylierung der EGFR wurde mit 20 oder 50 μ M Tyrphostin für 1 h inhibiert (Spuren 5, 7), bevor Sorbitol für 1 h zugegeben wurde (Spuren 6, 8). Als Kontrolle wurde Tyrphostin weggelassen und die Zellen mit dem gleichen Volumen an DMSO inkubiert (Spuren 3, 4). Je 50 μ g der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und phosphorylierter (=aktivierter) EGFR sowie gesplante Procaspase-8 im Western Blot nachgewiesen. Um zu bestätigen, dass es sich bei den Phosphotyrosin-Banden um EGFR handelt, wurde die Membran gestrippt und die Gesamtmenge an EGFR nachgewiesen (nicht gezeigt). Sorbitol allein führt zu einer starken Aktivierung der EGFR, die durch Behandlung mit Tyrphostin AG 1478 verhindert werden kann. In HaCaT/E5 lässt sich eine starke Aktivierung von Caspase-8 nachweisen, die nicht durch den Inhibitor beeinflusst wird.

Spur 1: unbehandelte Zellen
 Spur 2: Sorbitol 1 h
 Spur 3: DMSO 1 h
 Spur 4: DMSO 1 h + Sorbitol 1 h

Spur 5: 20 μ M AG 1478 1 h
 Spur 6: 20 μ M AG 1478 1 h + Sorbitol 1 h
 Spur 7: 50 μ M AG 1478 1 h
 Spur 8: 50 μ M AG 1478 1 h + Sorbitol 1 h

Tyrphostin AG 1478 ist ein spezifischer Inhibitor, der die Phosphorylierung des EGFR verhindert, indem er sich kompetitiv in Bezug auf ATP verhält.

Wie im oberen Teil von Abb. 5.15 zu sehen ist, kann die Aktivierung des EGFR mit diesem Inhibitor verhindert werden. Die Aktivierung des Rezeptors wurde im Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für Phosphotyrosin dargestellt. Obwohl eine deutliche Hemmung der Aktivität der EGFR für beide Konzentrationen des Inhibitors zu beobachten war, hatte dies keine signifikante Wirkung auf die Spaltung von Procaspase-8 (Abb. 5.15; unterer Teil).

Eine Inhibierung der MAPK Kinase MEK-1, welche durch die EGFR-Kaskade aktiviert wird, mit dem spezifischen Inhibitor PD 98059 hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Sorbitol-induzierte Caspase-8 Spaltung (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den Inhibitoren SB 203580 und AG 1478 handelt es sich bei PD 98059 um einen zu ATP nicht-kompetitiven Inhibitor, der die Aktivierung von MEK-1 durch Raf blockiert und somit die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP Kinasen p42/44 verhindert.

Da in den oben beschriebenen Experimenten keine Apoptose in den HaCaT/pMSG Zellen auslösbar war, sollte die Integrität dieses Systems überprüft werden, indem eine länger andauernde Sorbitol-Behandlung durchgeführt wurde. Dazu wurden alle genannten Versuche wiederholt und die HaCaT/pMSG und E5 Zellen für 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h und 4 h mit Sorbitol behandelt, ohne eine Erholungsphase anzuschließen. Unter diesen Bedingungen ließ sich nach einer Sorbitol-Behandlung für 1 h oder länger auch in der Kontrollzelllinie HaCaT/pMSG Apoptose auslösen, wenn auch deutlich schwächer und verzögert im Vergleich zu den HaCaT/E5 Zellen (nicht gezeigt).

5.2.9. HPV-16 E5 sensitiviert HaCaT Zellen für Apoptose auch bei niedrigeren Temperaturen.

Die beobachtete Wirkung von E5 auf die Sorbitol-induzierte Apoptose könnte als das Ergebnis einer veränderten Membranzusammensetzung in den HaCaT/E5 Zellen verstanden werden, die möglicherweise durch dieses stark hydrophobe Protein verursacht wird. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass man einen unterschiedlichen Umsatz von mehreren Membranphospholipiden in Kontroll- und E5-transfizierten Mausfibroblasten nachweisen

konnte (Crusius et al., 1999). Man könnte also erwarten, dass der Einbau von E5 in die Membran zu einer erhöhten Membran-Fluidität und gleichzeitig zu einer Erniedrigung der Transitionstemperatur führt. Um diese Idee zu überprüfen, wurden HaCaT/pMSG und E5 bei 37°C und 22°C für 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h und 4 h mit Sorbitol behandelt, ohne eine Erholungsphase anzuschließen. In Abb. 5.16 ist die Spaltung von PARP unter diesen Bedingungen im Western Blot dargestellt (siehe 4.4.1.).

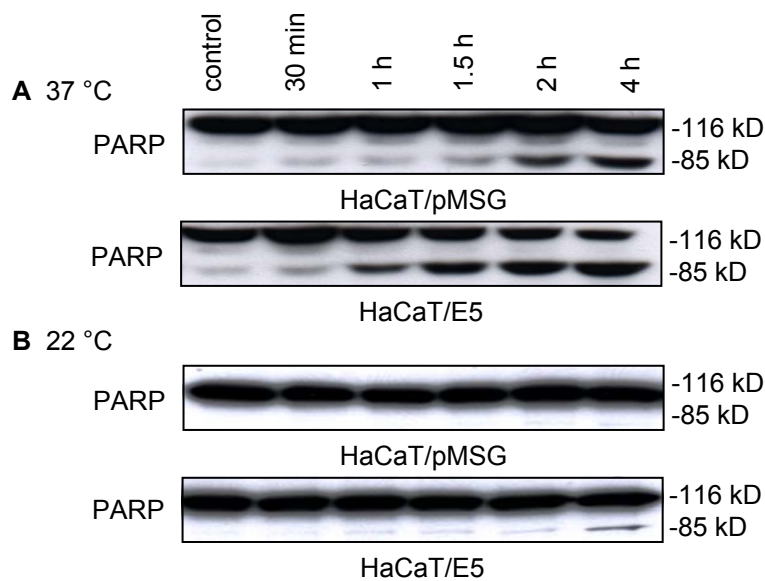


Abb. 5.16: PARP Spaltung nach Sorbitol-Behandlung bei 37°C und 22°C. HaCaT/pMSG und E5 wurden ausgehungert und mit Sorbitol für 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h und 4 h behandelt ohne anschließende Erholungsphase. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltenes PARP im Western Blot nachgewiesen.

- A** Bei 37°C zeigen die HaCaT/E5 Zellen eine signifikant erhöhte Menge an PARP Spaltung im Vergleich zu HaCaT/pMSG.
B Bei 22°C ist PARP Spaltung in den HaCaT/E5 Zellen nach 4 h Sorbitol-Behandlung zu sehen, in HaCaT/pMSG ist kaum Spaltung nachweisbar.

Bei 37°C begann die PARP Spaltung in HaCaT/E5 Zellen nach 1 h Sorbitol und steigerte sich bis zum Ende des Experiments (Abb. 5.16A). Die Zunahme an gespaltenem PARP (85 kD) korrelierte hierbei mit einem stetigen Verlust der ungespaltenen aktiven Form (116 kD). In der Kontrollzelllinie konnte PARP Spaltung erst nach 2 h nachgewiesen werden, die während des Versuchs anstieg, aber immer geringer war als in den HaCaT/E5.

Bei 22 °C war die Menge an gespaltenem Protein im Vergleich zu 37°C wie erwartet signifikant erniedrigt (Abb. 5.16B). Im Gegensatz zu den HaCaT/E5 konnte in den HaCaT/pMSG kaum PARP Spaltung nachgewiesen werden. Wenn man die Ergebnisse bei 37°C mit denen bei 22°C vergleicht, so

scheint die PARP Spaltung in HaCaT/E5 Zellen weniger stark durch die Temperaturerniedrigung beeinträchtigt zu werden, als in den Kontrollzellen. Allerdings ist die verwendete Technik nicht genau genug, um die Unterschiede in der PARP Spaltung zu quantifizieren.

5.2.10. Die Wirkung von E5 auf die Apoptose ist nicht nur auf HaCaT Zellen begrenzt.

Um zu zeigen, dass die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber osmotischem Stress nicht nur auf die polyklonale HaCaT/E5 Zelllinie beschränkt ist, wurde zusätzlich die Wirkung von E5 in der Mausfibroblasten Zelllinie A31 untersucht (Leechanachai et al., 1992).

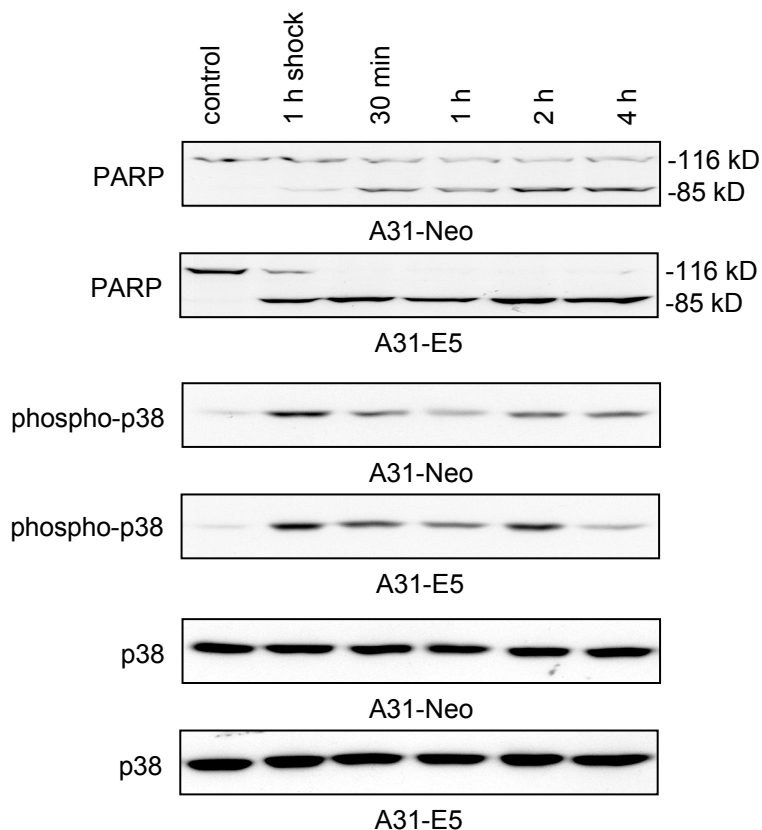


Abb. 5.17: PARP Spaltung in A31 Mausfibroblasten nach Sorbitol-Behandlung. A31-Neo und A31-E5 wurden ausgehungert und mit Sorbitol für 1 h behandelt wie im Text beschrieben. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltenes PARP, phosphorylierte p38 Kinase und die Gesamtmenge an p38 mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. In den A31-E5 Zellen kann eine vollständige PARP Spaltung sofort nach dem Schock beobachtet werden, wohingegen in A31-Neo noch ungespaltenes PARP bis zum Ende des Experiments erhalten bleibt. Wie durch die nahezu gleichbleibende Menge an aktivierter p38 Kinase zu sehen ist, erholen sich die Zellen nur schlecht von dem Schock. Als Kontrolle wurde die Membran gestrippt und die Gesamtmenge von p38 dargestellt.

Hierzu wurden die stabilen polyklonalen Zelllinien A31-E5, die permanent E5 exprimieren, und A31-Neo, die mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren, verwendet. Die Zellen wurden kultiviert und ausgehungert wie in 4.2.1.2. beschrieben, bevor Apoptose durch Behandlung mit 0,6 M Sorbitol für 1 h ausgelöst wurde. Die Zellen wurden danach mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min, 1 h, 2 h und 4 h mit Kulturmedium ohne FCS weiterkultiviert.

Im Vergleich zu den A31-Neo Zellen konnte eine erhöhte Spaltung von PARP in den A31-E5 Zellen im Western Blot beobachtet werden (Abb. 5.17). Der Sorbitolschock führte in den A31-E5 zu einer sofortigen und annähernd vollständigen PARP Spaltung, wohingegen in den A31-Neo signifikante Mengen an ungespaltenem PARP bis zum Ende des Experiments erhalten blieben. Im Gegensatz zu den Keratinocyten konnten sich die Fibroblasten nicht von dem osmotischen Schock erholen, wie durch die beinahe gleichbleibende Menge an phosphorylierter p38 Kinase erkennbar war (Abb. 5.17).

Es ist nicht erstaunlich, dass die beiden Zelltypen Unterschiede in Bezug auf die Details ihrer Antwort auf osmotischen Stress zeigen; eines ist ihnen jedoch gemeinsam:

Die Anwesenheit von HPV-16 E5 in humanen Keratinocyten und auch in Mausfibroblasten scheint die Empfindlichkeit für die Induktion der Apoptose, ausgelöst durch osmotischen Stress, zu erhöhen.

Nachdem beobachtet werden konnte, dass HPV-16 E5 die Zellen für Stress-vermittelte Apoptose empfindlicher macht, stellte sich nun die Frage nach der physiologischen Relevanz für das Virus. Da eine virale Infektion im Allgemeinen nicht von einem osmotischen Schock begleitet wird, kann es nicht ein selektiver Vorteil für das Virus sein und damit beinahe sicher keine physiologische Hauptfunktion des viralen Proteins darstellen. Diese Beobachtung lässt sich als das Ergebnis eines durch Sorbitol hervorgerufenen Nebeneffektes von E5 betrachten, der während einer natürlichen Infektion keine Relevanz besitzt. Jedoch enthüllt die destabilisierende Wirkung von E5 auf die Wirtszellmembranen einen möglichen Schwachpunkt des Virus, der vielleicht eine gezielte Schädigung HPV-16-infizierter Zellen erlauben könnte.

5.3. Durch die Liganden TRAIL und FasL induzierte Apoptose

Im Folgenden wurde die Wirkung von E5 auf die durch spezifische Liganden der Todesrezeptoren ausgelöste Apoptose untersucht. Es wurden der „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) und der „Fas Ligand“ (FasL) verwendet, da die Rezeptoren für diese Liganden im Zielgewebe des Virus exprimiert werden (Das et al., 2000; Ryu et al., 2000).

5.3.1. Die Aktivierung von Caspase-3 nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in *Raft*-Kulturen von HaCaT/E5 Zellen ist stark reduziert.

Um dem natürlichen System möglichst nahe zu sein, wurden *Raft*-Kulturen von HaCaT/pMSG und E5 Zellen angefertigt. Mit Hilfe dieser Kulturtechnik können die Zellen differenzieren und eine hautähnliche Schichtung ausbilden (siehe 4.2.1.4.). Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Pascal Tomakidi und Annette Kohl (Poliklinik für Kieferorthopädie der Universitäts-Mund-Zahn und Kieferklinik, Heidelberg) durchgeführt. Hierzu wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen als *Raft*-Kulturen für 5 Tage angezüchtet, bevor sie 48 h ausgehungert und anschließend für 24 h mit 500 ng/ml TRAIL oder 150 ng/ml FasL behandelt wurden. Danach wurden die Gewebestückchen eingefroren und Gefrierschnitte angefertigt. Aktivierte Caspase-3 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz grün dargestellt, die Zellkerne mit Propidium Iodid rot gegengefärbt (Abb. 5.18). In ausgehungerten, aber sonst unbehandelten HaCaT/E5 (links oben) und HaCaT/pMSG (links unten) zeigten sich nur wenige Caspase-3 positive Zellen in vergleichbarer Menge. Im Gegensatz hierzu war nach TRAIL- (unten) und FasL-Behandlung (oben) deutlich Apoptose in den HaCaT/pMSG Zellen feststellbar, wohingegen die HaCaT/E5 Zellen vor diesem Effekt geschützt wurden. Als interne Kontrolle, dass der beobachtete Schutzeffekt auf die Anwesenheit von E5 zurückzuführen ist, wurde in einem Parallelansatz kein Dexamethason zugegeben (rechts), das für die Induktion der E5 Expression notwendig ist. In diesem Fall verhielten sich die Zellen ähnlich wie die Kontrollzelllinie HaCaT/pMSG und Apoptose war deutlich nachweisbar.

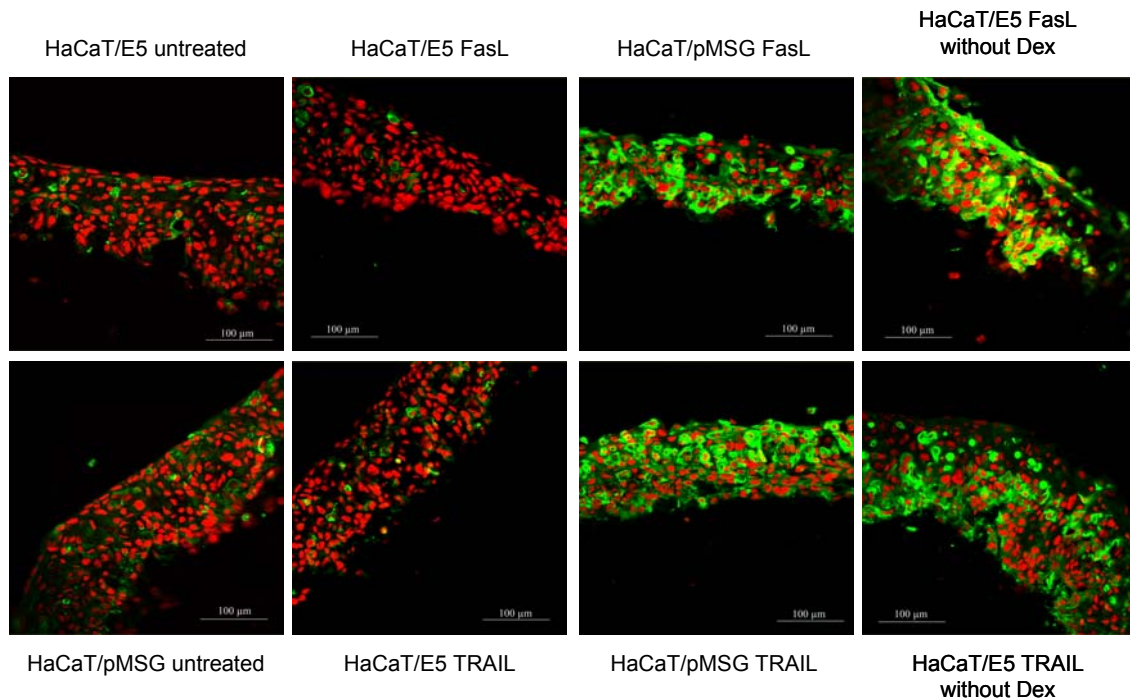


Abb. 5.18: Aktivierung von Caspase-3 nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in Raft-Kulturen. Die Aktivierung von Caspase-3 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten der Raft-Kulturen von HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die Zellkerne sind in rot, aktivierte Casp.-3 in grün gezeigt.

Die weiteren Versuche wurden an Monolayer Kulturen der HaCaT/pMSG und E5 Zellen durchgeführt.

5.3.2. Die Aktivierung von Caspase-3 nach FasL- oder TRAIL-Behandlung in Monolayer Kulturen von HaCaT/E5 Zellen ist stark reduziert.

Apoptose wurde durch die Zugabe von 500 ng/ml TRAIL oder 150 ng/ml FasL ausgelöst, nachdem die Zellen zuvor ausgehungert worden waren (siehe 4.2.1.1.). In Abb. 5.19A wurde Apoptose durch die Spaltung von Procaspase-3 mittels indirekter Immunfluoreszenz in grün dargestellt, die Zellkerne mit Propidium Iodid in rot gegengefärbt.

Die oberen Bilder zeigen unbehandelte HaCaT/pMSG (links) und E5 Zellen (rechts); nur wenige grün fluoreszierende Zellen waren sichtbar. Wie erwartet konnte eine große Zahl apoptotischer Zellen nach 8 h TRAIL-Behandlung in HaCaT/pMSG (unten links) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde die Menge an grün fluoreszierenden HaCaT/E5 Zellen nur geringfügig durch die TRAIL-Behandlung erhöht (unten rechts). Die gleichen Ergebnisse wurden auch nach FasL-Behandlung erhalten (nicht gezeigt).

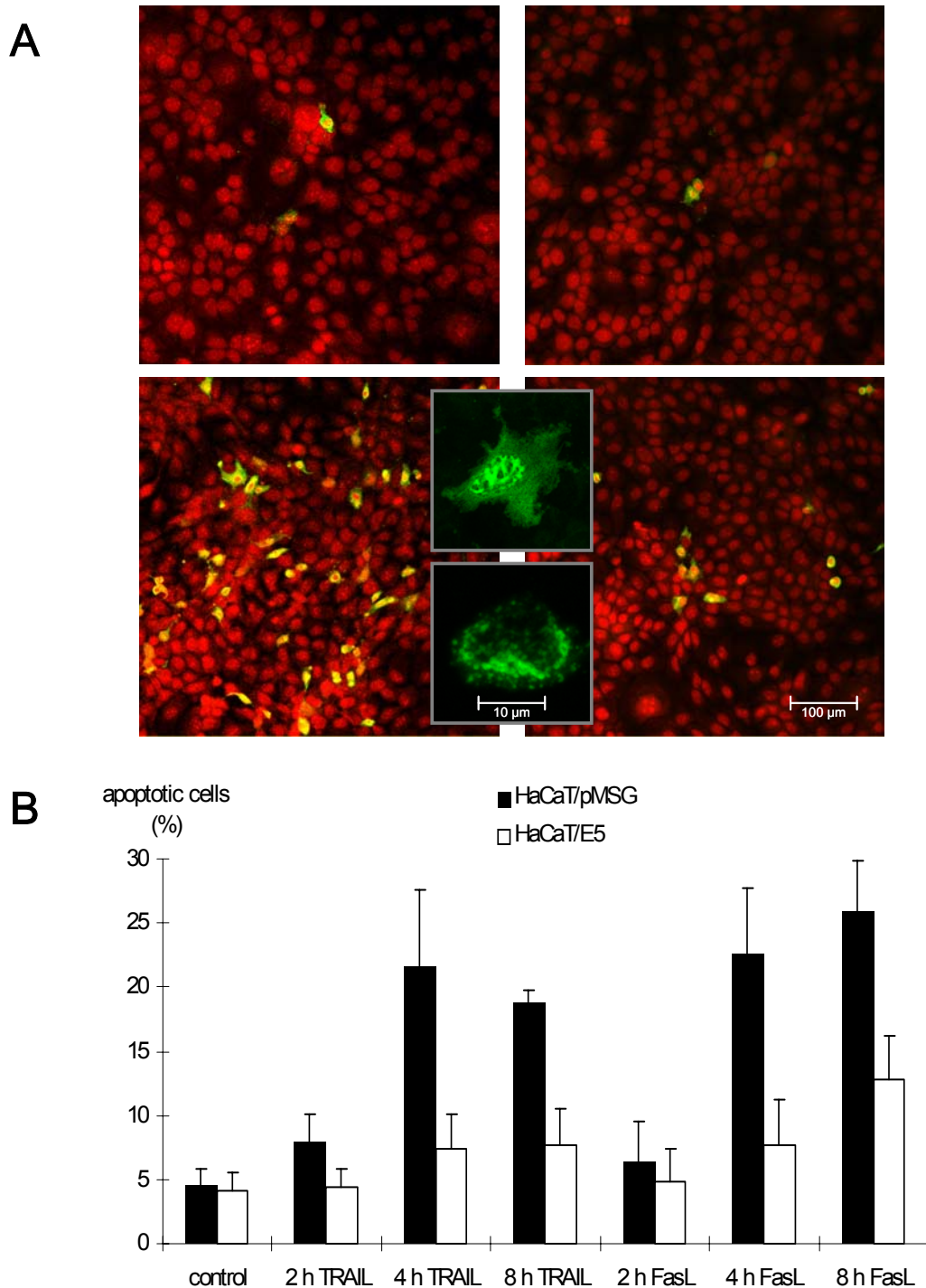


Abb. 5.19: Aktivierung von Caspase-3 nach TRAIL- und FasL-Behandlung.

A Die Aktivierung von Caspase-3 in HaCaT/pMSG (links) und HaCaT/E5 Zellen (rechts) wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt. Die Zellkerne sind in rot, aktivierte Caspase-3 in grün gezeigt.

Oben: Fluoreszierende Zellen in Abwesenheit von TRAIL

Unten: Fluoreszierende Zellen nach 8 h TRAIL-Behandlung

In den Vergrößerungen sind zwei repräsentative Zellen in verschiedenen Stadien der Apoptose gezeigt (nur aktivierte Casp.-3 dargestellt).

B Quantitative Analyse apoptotischer HaCaT/pMSG (schwarz) und E5 (weiß) Zellen, entweder unbehandelt (control) oder behandelt für 2 h, 4 h und 8 h mit TRAIL oder FasL. Jeder Datenpunkt des Histogramms ist der Mittelwert aus 4 Messungen. Für die Fehlerschätzung wurde der Student's t-Test mit 3 Freiheitsgraden verwendet. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem das wahre Populationsmittel mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% gefunden wird.

Die Caspase-3 positiven Zellen zeigten die für verschiedene Stadien der Apoptose typischen Merkmale wie die Kondensation des Chromatins oder das „membrane blebbing“ (vgl. Abb. 5.9), hier für zwei repräsentative Zellen in höherer Vergrößerung dargestellt (kleine Bildausschnitte).

In Abb. 5.19B ist die Quantifizierung der Caspase-3 positiven HaCaT/pMSG (schwarz) und E5 Zellen (weiß) als Histogramm dargestellt, in dem der Prozentsatz an unbehandelten (control) oder für 2 h, 4 h und 8 h mit TRAIL oder FasL behandelten apoptotischen Zellen gezeigt ist. Im Vergleich zu den HaCaT/pMSG ist die Menge an apoptotischen HaCaT/E5 Zellen nach TRAIL- oder FasL-Behandlung signifikant um mehr als einen Faktor 2 reduziert.

5.3.3. Die Spaltung von Procaspase-8, -3 und PARP nach TRAIL-Behandlung ist in HaCaT/E5 Zellen nicht nachweisbar.

Im Folgenden sollte die Weiterleitung des Apoptosesignals entlang des Todesrezeptorweges untersucht werden. Hierzu wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen ausgehungert und dann für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h mit 500 ng/ml TRAIL behandelt.

Die Wirkung auf die Zellen wurde durch die Spaltung der Initiator Caspase-8 in die 41 und 43 kD Fragmente gemessen (Abb. 5.20A). In HaCaT/pMSG Zellen begann die Aktivierung nach 1 h TRAIL-Behandlung und stieg stetig im Verlauf des Experiments an. In den E5-exprimierenden Zellen konnte keine Spaltung beobachtet werden.

Auf die Aktivierung von Caspase-8 folgte die Spaltung von Procaspase-3 in die 17 und 19 kD Fragmente wie in Abb. 5.20B gezeigt. In HaCaT/pMSG, aber nicht in HaCaT/E5 Zellen, konnte die Aktivierung von Caspase-3 nach 2 h TRAIL-Behandlung nachgewiesen werden, die bis zum Ende des Versuchs anstieg.

Einen Beweis für die katalytische Kompetenz von aktivierter Caspase-3 lieferte die Spaltung des Substrates Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in das 85 kD große Fragment (Abb. 5.20C), die gleichzeitig mit der Aktivierung von Caspase-3 auftrat und sich nur in HaCaT/pMSG Zellen nachweisen ließ. In HaCaT/E5 Zellen konnte weder Procaspase-3 noch PARP Spaltung beobachtet werden.

Um zu zeigen, dass die Apoptose durch TRAIL-Behandlung ausgelöst wurde, wurde ein Ligand-Blockierungs-Experiment durchgeführt. Dazu wurden 3 µg/ml eines neutralisierenden Antikörpers gegen TRAIL zusammen mit dem Liganden für 8 h auf die Zellen gegeben und PARP Spaltung nachgewiesen (Abb. 5.20D). In Übereinstimmung mit den oben aufgeführten Ergebnissen trat PARP Spaltung in HaCaT/pMSG Zellen auf und war in Anwesenheit des neutralisierenden Antikörpers nicht nachweisbar. In HaCaT/E5 konnte in keinem der Fälle PARP Spaltung gezeigt werden.

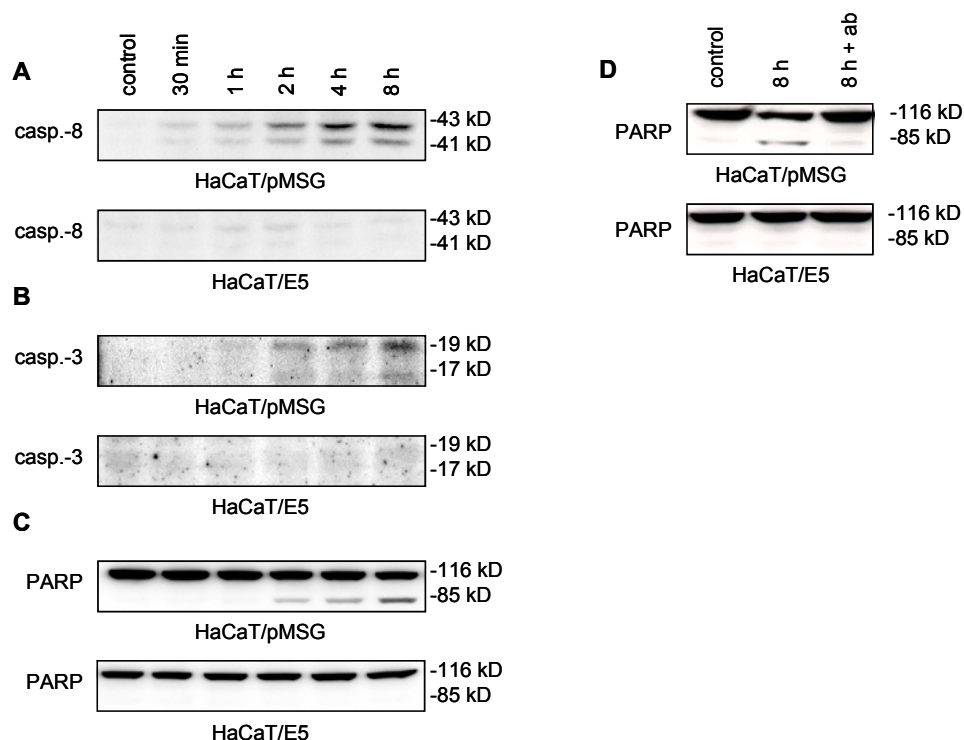


Abb. 5.20: Spaltung von Procaspase-8, -3 und PARP nach TRAIL-Behandlung.

HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und mit 500 ng/ml TRAIL behandelt. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltene Procaspase-8, -3 und PARP mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen.

- A** In HaCaT/pMSG Zellen beginnt die Spaltung von Procaspase-8 1 h nach TRAIL Zugabe und nimmt bis zum Ende des Experimentes zu. In HaCaT/E5 Zellen kann keine Spaltung beobachtet werden.
- B** Spaltung der Procaspase-3 tritt nach 2 h auf und steigt bis zum Ende des Experimentes in HaCaT/pMSG an, wohingegen keine signifikante Aktivierung in HaCaT/E5 beobachtet werden kann.
- C** In HaCaT/pMSG aber nicht in HaCaT/E5 Zellen wird PARP nach 2 h gespalten und erhöht sich im Verlauf des Versuchs.
- D** Die apoptotische Wirkung von TRAIL auf die PARP Spaltung in HaCaT/pMSG kann durch einen neutralisierenden Antikörper (ab) gegen TRAIL aufgehoben werden (Spur 3).

5.3.4. Die Spaltung von Procaspase-8 und PARP nach FasL-Behandlung ist in HaCaT/E5 Zellen deutlich reduziert.

Nach FasL-Behandlung ließ sich ebenfalls Apoptose entlang des Todesrezeptorweges nachweisen (Abb. 5.21). HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und dann für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h mit 150 ng/ml FasL behandelt. In HaCaT/pMSG Zellen konnte eine schwache Procaspase-8 Spaltung nach 4 h festgestellt werden, die nach 8 h stark zunahm (Abb. 5.21A). Die Spaltung in HaCaT/E5 war kaum detektierbar nach 4 h FasL-Behandlung und nahm auch nach 8 h nur geringfügig zu. Ähnlich zu den Experimenten mit TRAIL konnte eine starke Reduktion der PARP Spaltung in HaCaT/E5 Zellen festgestellt werden (Abb. 5.21B).

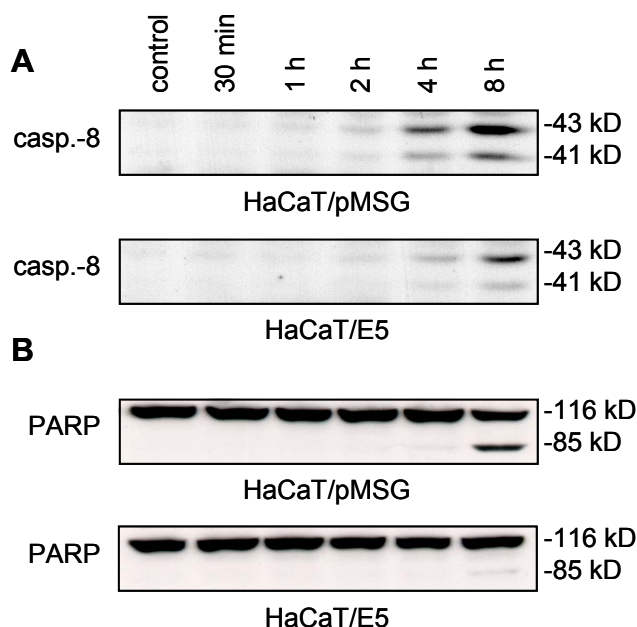


Abb. 5.21: Spaltung von Procaspase-8 und PARP nach FasL-Behandlung. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und mit 150 ng/ml FasL behandelt. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltene Procaspase-8 und PARP mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen.

- A** Nach 4 h kann in HaCaT/pMSG Zellen eine schwache Procaspase-8 Spaltung detektiert werden, die nach 8 h stark zunimmt. In HaCaT/E5 ist nach 4 h kaum, nach 8 h eine schwache Spaltung nachweisbar.
- B** PARP Spaltung tritt erst nach 4 h auf und nimmt nach 8 h in HaCaT/pMSG stark zu. Dagegen kann nur geringe Spaltung nach 8 h in HaCaT/E5 nachgewiesen werden.

5.3.5. Die Expression des Caspase-8 Inhibitors c-FLIP wird nicht durch E5 beeinflusst.

Da die anti-apoptotische Wirkung von E5 bereits auf Höhe der Caspase-8 Aktivierung feststellbar war, konnte man erwarten, dass E5 mit dem Beginn der Signalkaskade interagiert. E5 könnte z.B. in der Zelle zu einer Überexpression

des Caspase-8 Inhibitors c-FLIP führen und so die Rekrutierung von Procaspase-8 an den DISC („Death-inducing signaling complex“) verhindern. Dieser Inhibitor besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit zu Procaspase-8 und bindet mit einer höheren Affinität an das Adapterprotein FADD („Fas associated Death domain protein“) (Scaffidi et al., 1999; Krueger et al., 2001), welches wiederum an den Todesrezeptor (Fas, DR4, DR5) bindet. Im Folgenden würde es anstelle einer Aktivierung von Caspase-8 zu einer Spaltung des Inhibitors c-FLIP kommen, wodurch die Weiterleitung der Apoptose blockiert wird.

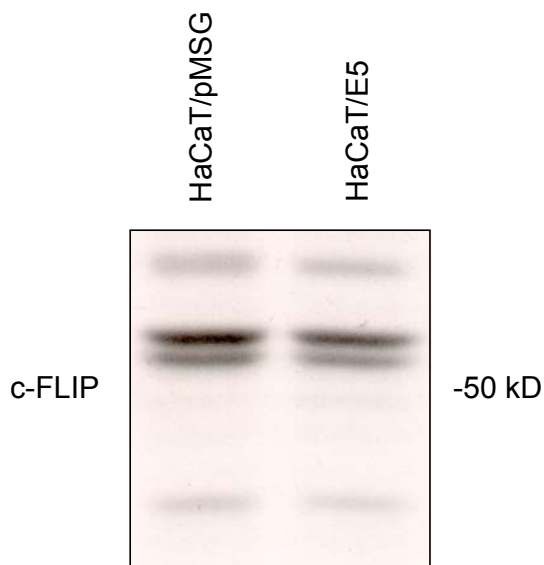


Abb. 5.22: Einfluss von E5 auf die Expression von c-FLIP. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die verschiedenen Spleißvarianten von c-FLIP wurden mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Es lassen sich keine Unterschiede zwischen den Zelllinien feststellen.

In Abb. 5.22 ist die Expression von verschiedenen Spleißvarianten von c-FLIP in unbehandelten HaCaT/pMSG und E5 Zellen im Western Blot gezeigt. Es ließen sich keine Unterschiede in der Expression feststellen, was nicht unerwartet war, da sich sonst die Experimente mit Sorbitol-induzierter Apoptose nur schwer erklären lassen würden, da in diesem Fall die HaCaT/pMSG Zellen vor Apoptose geschützt waren.

5.3.6. Die Oberflächenexpression von Fas, aber nicht von DR4 und DR5, ist in HaCaT/E5 Zellen reduziert.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass E5 auf die Todesrezeptoren einwirkt. Um dies zu überprüfen, wurde die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren Fas, DR4 (TRAIL-R1) und DR5 (TRAIL-R2) mittels FACS Analyse untersucht (Abb. 5.23; siehe 4.4.3.). HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden für 48 h in der Anwesenheit von 1 µM Dexamethason ausgehungert, bevor die FACS Analyse durchgeführt wurde.

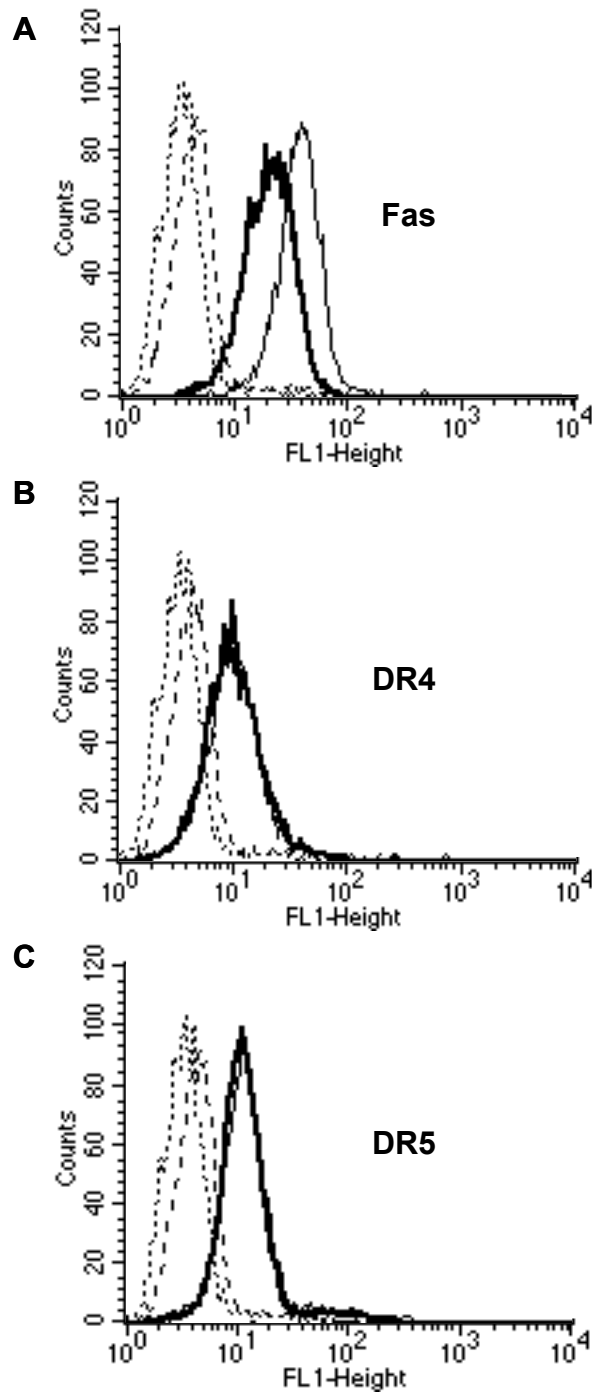


Abb. 5.23: Oberflächenexpression der Todesrezeptoren Fas, DR4 und DR5. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und die Oberflächenexpression von Fas, DR4 und DR5 mittels FACS analysiert. Die Fluoreszenz der Todesrezeptoren in HaCaT/pMSG (durchgezogene Linie) und HaCaT/E5 (dicke durchgezogene Linie) ist im Vergleich zu der Fluoreszenz des FITC-konjugierten Zweitantikörpers allein dargestellt (pMSG: gestrichelte Linie; E5: gepunktete Linie).

A Die Oberflächenexpression von Fas ist in HaCaT/E5 um Faktor 1,8 reduziert im Vergleich zu HaCaT/pMSG.

B,C Keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien lassen sich in Bezug auf die Oberflächenexpression von DR4 und DR5 feststellen.

Es konnte in der Tat festgestellt werden, dass die Oberflächenexpression von Fas Rezeptoren in unbehandelten HaCaT/E5 Zellen um den Faktor 1,8 reduziert ist im Vergleich zu den HaCaT/pMSG Zellen (Abb. 5.23A). Dieser Befund könnte erklären, warum HaCaT/E5 unempfindlicher gegenüber FasL-Behandlung sind als HaCaT/pMSG Zellen. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede in der Expression der TRAIL Rezeptoren DR4 und DR5 nachgewiesen werden (Abb. 5.23B,C), was darauf hindeutet, dass es einen anderen Mechanismus geben muss, der in den HaCaT/E5 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose schützt.

5.3.7. Die TRAIL-induzierte DISC Formation ist in HaCaT/E5 Zellen verhindert.

Es wurde der Zusammenbau des DISC untersucht, indem die Todesrezeptoren DR4 bzw. DR5 zusammen mit ihrem Adapterprotein FADD co-immunpräzipitiert wurden (Abb. 5.24; siehe 4.4.2.).

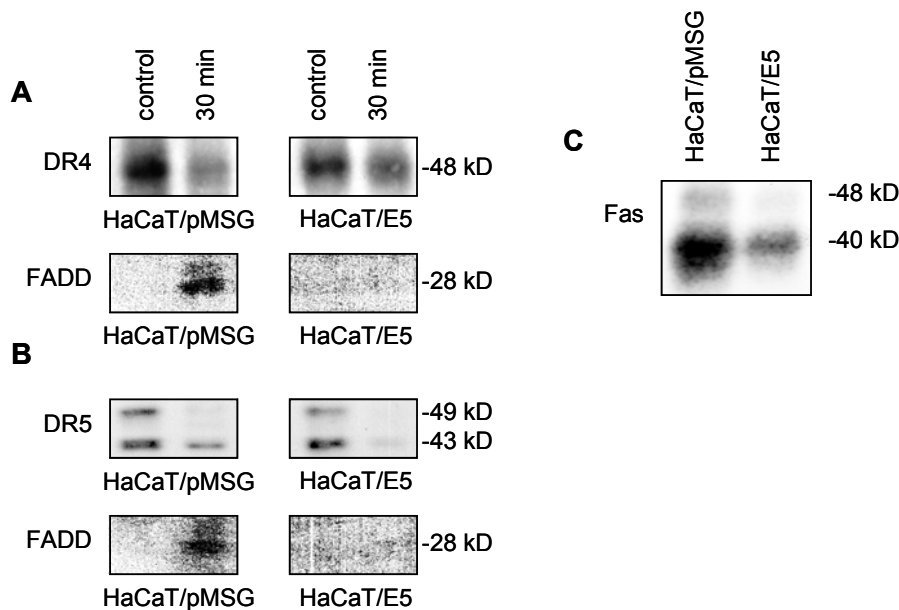


Abb. 5.24: Nachweis der TRAIL-induzierten DISC Formation durch Co-Immunpräzipitation von FADD. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und für 30 min mit TRAIL behandelt, bevor eine Immunpräzipitation der Rezeptoren DR4 und DR5 durchgeführt wurde. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und DR4, DR5 und FADD mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen.

- A** Obwohl gleiche Mengen an DR4 in beiden Zelllinien gefunden werden (oben), kann nach TRAIL-Behandlung die FADD Bindung an den Rezeptor nur in den HaCaT/pMSG Zellen nachgewiesen werden (unten links).
- B** Trotz ähnlicher Expression von DR5 (oben), kann die TRAIL-induzierte DISC Formation nur in HaCaT/pMSG detektiert werden (unten links).
- C** In unbehandelten HaCaT/E5 Zellen ist im Vergleich zu HaCaT/pMSG die Gesamt-expression an Fas Rezeptoren um mehr als einen Faktor 2 reduziert, wie durch die Immunpräzipitation gezeigt.

HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden in Anwesenheit von 1 μ M Dexamethason ausgehungert und für 30 min mit 500 ng/ml TRAIL behandelt. 700 bzw. 800 μ g der Zellextrakte wurden mit je 3 μ g DR4 bzw. DR5 Antikörpern präzipitiert. Die Mengen an DR4 und DR5 Rezeptoren in unbehandelten (control) HaCaT/pMSG und E5 Zellen waren sehr ähnlich, wie nach der FACS Analyse zu erwarten gewesen war (Abb. 5.23B,C). Nach der 30minütigen TRAIL-Behandlung nahm die Menge an DR4 und DR5 möglicherweise durch Degradation der Rezeptoren ab (Abb. 5.24A,B oben). In HaCaT/pMSG Zellen konnte nach TRAIL-Behandlung bei beiden Rezeptoren eine schwache FADD Bande nachgewiesen werden (Abb. 5.24A,B unten), nicht jedoch in den HaCaT/E5 Zellen. Dies bedeutet, dass die Resistenz von HaCaT/E5 Zellen gegenüber TRAIL darauf zurückzuführen ist, dass diese Zellen keinen funktionellen DISC ausbilden können und somit das Apoptosesignal nicht weitergeleitet werden kann.

5.3.8. Die Gesamtexpression an Fas Rezeptoren ist in HaCaT/E5 Zellen stark reduziert.

Im Gegensatz zu den DR4 und DR5 Rezeptoren ist in unbehandelten HaCaT/E5 Zellen im Vergleich zu HaCaT/pMSG die Gesamtexpression an Fas Rezeptoren um mehr als einen Faktor 2 reduziert, wie durch Immunpräzipitation gezeigt wurde (Abb. 5.24C). Das deutet darauf hin, dass E5 dazu in der Lage ist, die Gesamtmenge an Fas Rezeptoren und nicht nur deren Oberflächenexpression herunterzuregulieren. Obwohl klar ist, dass nach FasL-Behandlung ein DISC ausgebildet worden sein muss, zumindest in den HaCaT/pMSG Zellen, konnte in keiner der Zelllinien co-immunpräzipitiertes FADD, trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlichen Mengen an Zellextrakten (bis zu 1 mg) und Inkubationszeiten (5 min, 30 min, 8 h), nachgewiesen werden.

5.3.9. Die Menge an GTP-Ras ist höher in HaCaT/E5 Zellen als in HaCaT/pMSG.

Da beschrieben worden war (Fenton et al., 1998), dass onkogenes Ras die Transkription des Fas Gens inhibiert, wurde die Menge an aktiviertem Ras in unbehandelten HaCaT/pMSG und E5 Zellen mittels Affinitätspräzipitation untersucht (Abb. 5.25; siehe 4.3.7.).

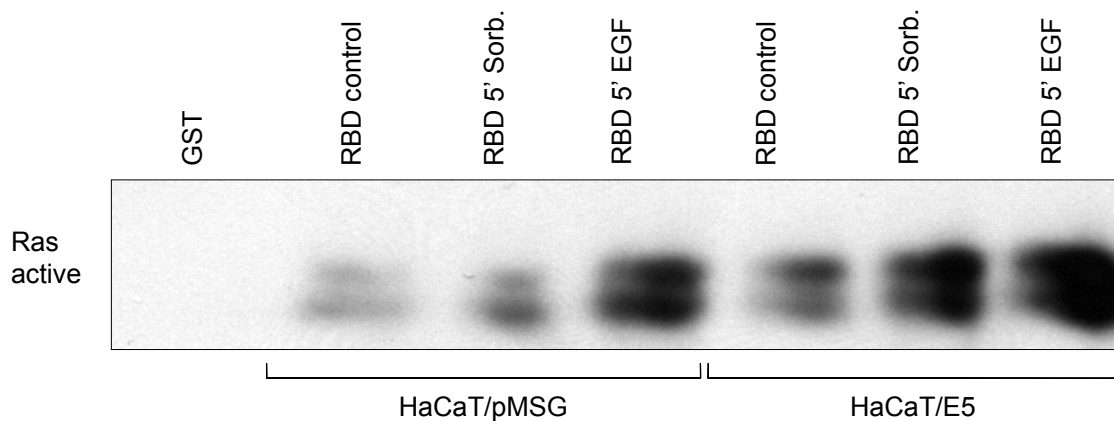


Abb. 5.25: Nachweis von GTP-Ras in HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen. HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden ausgehungert und 5 min mit Sorbitol bzw. 2,5 ng/ml EGF behandelt, bevor je 500 µg der Proteinextrakte der Zellen mit GST-RBD präzipitiert wurden. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Ras im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Kontrolle wurde GST ohne RBD verwendet (links). In HaCaT/E5 sind bereits bei unbehandelten Zellen (control) die Mengen an aktiviertem Ras deutlich höher als bei HaCaT/pMSG.

Hierbei diente ähnlich wie bei der Affinitätspräzipitation von Cdc42 und Rac1 (vgl. 5.1.3.) ein GST-Fusionsprotein mit einer für die aktivierte Form von Ras spezifischen Ras-Bindungsdomäne RBD (AS 1-149 aus humanem c-Raf) dazu, die GTP-gebundene Form von Ras aus den Zellextrakten zu präzipitieren. Als Negativkontrolle wurden mit Sorbitol behandelte HaCaT/pMSG und E5 Zellextrakte mit GST ohne den Fusionsproteinanteil verwendet (hier nur für HaCaT/pMSG gezeigt). Die Menge an aktiviertem Ras war bereits bei unbehandelten (control) HaCaT/E5 Zellen höher als in den HaCaT/pMSG Zellen und stieg nach Behandlung mit 0,6 M Sorbitol und EGF (2,5 ng/ml) für 5 min deutlich an. Da bereits im unbehandelten Zustand der Zellen die Menge an aktiviertem Ras in den E5-exprimierenden Zellen erhöht war, könnte möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus zur Regulierung der Fas Genexpression vorliegen, wie von Fenton et al. (1998) beschrieben wurde.

5.3.10. Der anti-apoptotische Effekt in HaCaT/E5 Zellen hängt von der E5 Expression ab.

Da die E5 Expression durch den Dexamethason-induzierbaren MMTV-Promotor kontrolliert wird, sollte die beobachtete anti-apoptotische Wirkung in HaCaT/E5 Zellen verschwinden, wenn der Promotor nicht aktiviert wird, wie bereits für die *Raft*-Kulturen gezeigt wurde (siehe Abb. 5.18). Um diese Erwartung zu bestätigen, wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen mit und ohne Dexamethason-Induktion (+Dex, -Dex) verglichen. Apoptose wurde durch die Zugabe von entweder 150 ng/ml FasL oder 500 ng/ml TRAIL für 24 h ausgelöst, nachdem die Zellen für 48 h in der An- oder Abwesenheit von 1 μ M Dexamethason ausgehungert worden waren (siehe 4.2.1.1.). Aktivierte Caspase-3 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz (siehe 4.4.4.) grün dargestellt, die Zellkerne mit Propidium Iodid rot gegengefärbt (Abb. 5.26A).

Ohne FasL- oder TRAIL-Behandlung zeigten sich nur wenige Caspase-3 positive Zellen, was auf einen niedrigen Hintergrund an apoptotischen Zellen in beiden Zelllinien hindeutet (linke Spalte; control). Nach Zugabe von FasL oder TRAIL für 24 h konnte sowohl mit als auch ohne Dexamethason-Behandlung eine große Menge an grün fluoreszierenden Zellen in HaCaT/pMSG nachgewiesen werden (oberer Teil der mittleren und rechten Spalten). In HaCaT/E5 Zellen konnte dagegen nach identischer Behandlung mit FasL oder TRAIL ein deutlicher Unterschied zwischen Dexamethason-behandelten (HaCaT/E5+Dex) und unbehandelten (HaCaT/E5-Dex) Zellen festgestellt werden (unterer Teil der mittleren und rechten Spalten). Die Menge an apoptotischen Zellen war in HaCaT/E5+Dex um ungefähr einen Faktor zwei reduziert im Vergleich zu HaCaT/E5-Dex.

In Abb. 5.26B ist die Quantifizierung der Ergebnisse als Histogramm dargestellt. Im Vergleich von HaCaT/E5-Dex mit HaCaT/pMSG-Dex ließ sich nach FasL- und TRAIL-Behandlung eine kleine Reduktion in der Zahl an apoptotischen Zellen feststellen. Dies könnte auf geringe Restmengen an E5 in den HaCaT/E5-Dex Zellen zurückzuführen sein; möglicherweise aufgrund einer niedrigen Degradationsrate des Membranproteins oder der „leakiness“ des MMTV-Promotors (Oelze et al., 1995).

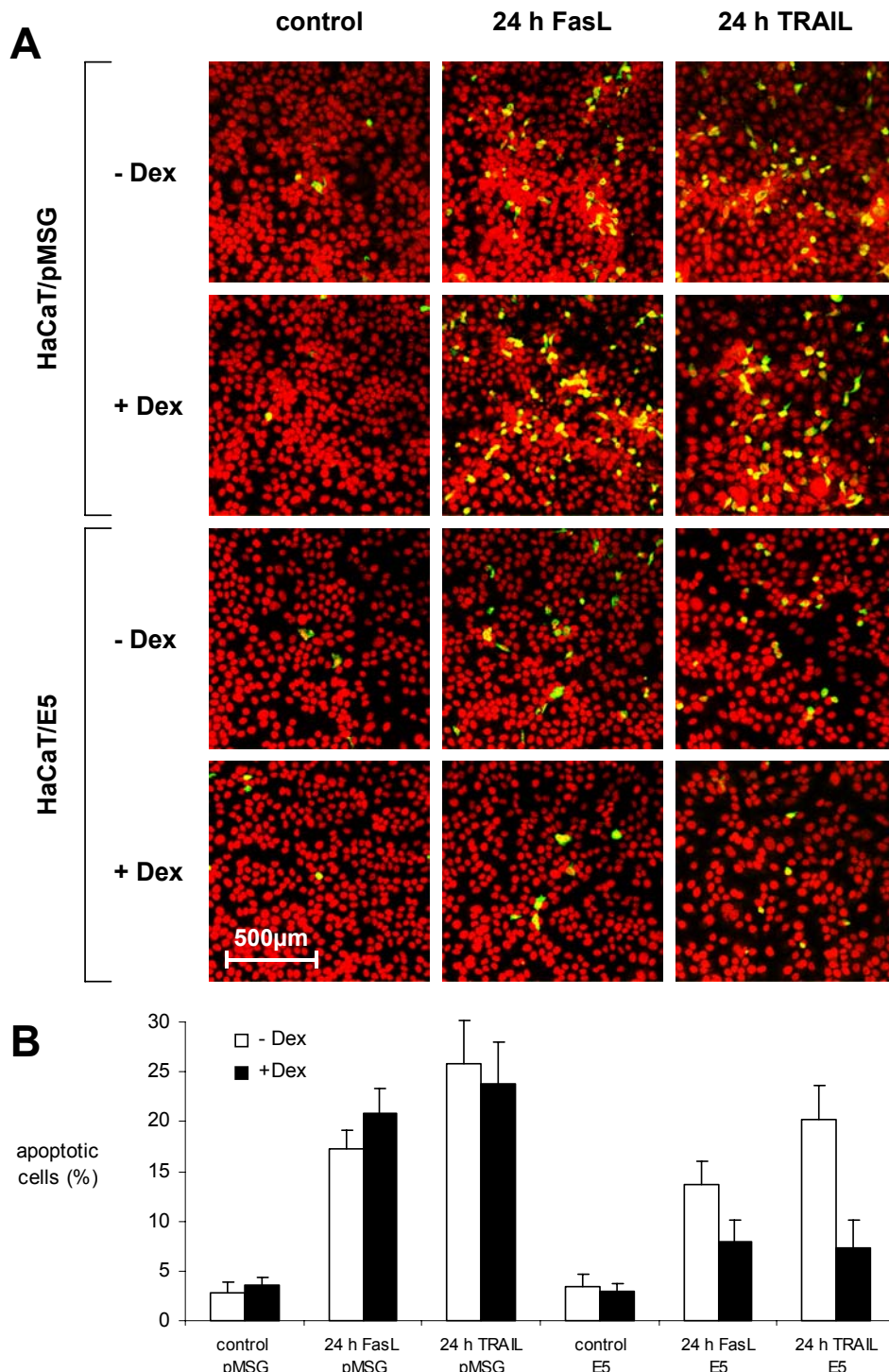


Abb. 5.26: Aktivierung von Caspase-3 nach 24 h FasL- oder TRAIL-Behandlung mit oder ohne Dexamethason-Induktion (+Dex, -Dex). HaCaT/pMSG und E5 Zellen wurden in An- (+Dex) oder Abwesenheit (-Dex) von 1 µM Dexamethason für 48 h ausgehungert, bevor Apoptose mit FasL- oder TRAIL-Behandlung für 24 h ausgelöst wurde.

A Die Aktivierung von Caspase-3 in HaCaT/pMSG (oberer Teil) und E5 Zellen (unterer Teil) wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dargestellt.

B Quantitative Analyse apoptotischer, uninduzierter (-Dex, weiß) oder induzierter (+Dex, schwarz) HaCaT/pMSG (links) und HaCaT/E5 Zellen (rechts), entweder unbehandelt (control) oder für 24 h mit FasL oder TRAIL behandelt. Jeder Datenpunkt des Histogramms ist der Mittelwert aus 5 bis 6 Messungen zufällig gewählter Felder eines Experiments. Für die Fehlerschätzung wurde der Student's t-Test mit 4 bis 5 Freiheitsgraden verwendet. Die Fehlerbalken stellen das Konfidenzintervall dar, in dem das wahre Populationsmittel mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% gefunden wird.

5.3.11. Die reduzierte Fas Oberflächenexpression in HaCaT/E5 Zellen ist nicht der einzige Grund für den Schutz vor FasL-vermittelter Apoptose.

Aufgrund von Abb. 5.23A und auch von Abb. 5.26 konnte man erwarten, einen stark von der E5-Konzentration abhängigen Effekt auf die Fas Oberflächenexpression in den HaCaT/E5 Zellen beobachten zu können. Hierzu wurden HaCaT/E5 und HaCaT/pMSG Zellen für 48 h in der An- (+Dex) oder Abwesenheit (-Dex) von 1 μ M Dexamethason ausgehungert (siehe 4.2.1.1.), bevor die Oberflächenexpression der Fas Rezeptoren mittels FACS Analyse bestimmt wurde (siehe 4.4.3.). Entgegen der Erwartung blieb die reduzierte Oberflächenexpression von Fas in HaCaT/E5 Zellen unverändert, auch wenn der MMTV-Promotor nicht induziert wurde (Tab. 5.1). Die FACS Analyse wurde zweimal wiederholt und lieferte im wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie in Abb. 5.23A gezeigt.

Die Gesamtmenge an Fas Protein, wie durch Immunpräzipitation (siehe 4.4.2.) mit Fas Antikörpern bestimmt wurde, änderte sich jedoch in beiden Zelllinien in Abhängigkeit von der Dexamethason-Induktion (Tab. 5.1). In HaCaT/E5+Dex Zellen war die Gesamtmenge an Fas niedriger als in HaCaT/E5-Dex, was daraufhin deutet, dass die Menge an Fas Gesamtprotein von der E5-Konzentration abhängig ist. Im Gegensatz dazu konnte in HaCaT/pMSG+Dex Zellen eine Zunahme an Fas Gesamtprotein beobachtet werden. Dies zeigt, dass das synthetische Glucocorticoid neben der Induktion des MMTV-Promotors zusätzliche Effekte verursacht, was letztendlich zu einer Zunahme der Gesamtmenge an Fas Proteinen führt. In sowohl HaCaT/pMSG-Dex als auch in HaCaT/E5-Dex wurde ungefähr die gleiche Menge an Fas Gesamtprotein gefunden, wohingegen nur in HaCaT/E5+Dex Zellen, nicht aber in HaCaT/pMSG+Dex, eine deutliche Reduktion an Fas Proteinen beobachtet werden konnte. Diese Reduktion steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abb. 5.24C.

Schließlich konnte mittels Northern Blot Analyse (siehe 4.1.11.) gezeigt werden, dass die Induktion des MMTV-Promotors kaum eine Wirkung auf die Fas mRNA Expression hatte (Tab. 5.1). Zwischen den beiden Zelllinien waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fas mRNA Expression nachweisbar (Tab. 5.1). Dies bedeutet, dass die erhöhte Menge an aktivierten Ras Proteinen (Abb. 5.25) in HaCaT/E5 Zellen nicht zu einer verstärkten

Transkription des Fas Gens führt, wie von Fenton et al. (1998) vorgeschlagen worden war.

	Fas mRNA ^a	Fas Gesamtprotein ^a	Fas Oberflächen-expression ^b
pMSG-Dex	1.00	1.00	1.00
pMSG+Dex	0.73±0.04	1.41±0.16	0.93±0.13
E5-Dex	0.69±0.14	1.15±0.16	0.44±0.06
E5+Dex	0.68±0.14	0.80±0.10	0.51±0.10

Tab. 5.1: Wirkung von Dexamethason auf die Fas Expression in HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen, wobei HaCaT/pMSG-Dex als Referenz dienen.

^a Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes wurden aus 3 unabhängigen Messungen bestimmt.

^b Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes wurden aus 2 unabhängigen Messungen bestimmt.

5.3.12. Die E5-exprimierenden Mausfibroblasten A31-E5 sind vor TRAIL-nicht aber vor FasL-vermittelter Apoptose geschützt.

Um der Frage nachzugehen, ob der beobachtete anti-apoptotische Effekt nicht nur auf die polyklonale HaCaT/E5 Zelllinie beschränkt ist, wurde zusätzlich die Wirkung von E5 in der Mausfibroblasten Zelllinie A31 untersucht (Leechanachai et al., 1992).

Hierzu wurden polyklonale A31-E5 Zellen, die permanent E5 exprimieren, mit A31-Neo, die mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren, verglichen. Die Zellen wurden kultiviert und ausgehungert wie in 4.2.1.2. beschrieben, bevor Apoptose durch die Zugabe von 500 ng/ml TRAIL oder 50 ng/ml FasL für 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h ausgelöst wurde (Abb. 5.27).

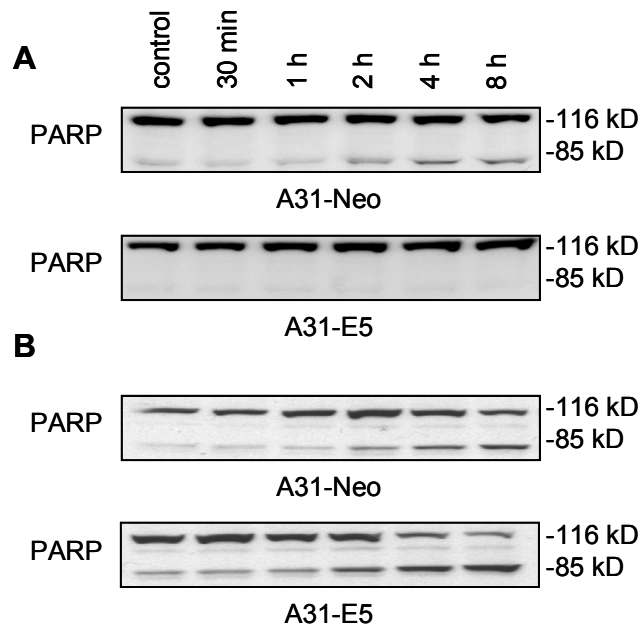


Abb. 5.27: PARP Spaltung in A31 Mausfibroblasten nach TRAIL- und FasL-Behandlung. A31-Neo und A31-E5 wurden ausgehungert und mit 500 ng/ml TRAIL oder 50 ng/ml FasL behandelt wie im Text beschrieben. Je 50 µg der Proteinextrakte der Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gespaltenes PARP mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen.

- A** In A31-Neo Zellen beginnt die PARP Spaltung 2 h nach TRAIL Zugabe und nimmt bis zu einer gleichbleibenden Menge nach 4 und 8 h zu. Keine signifikante Spaltung kann in A31-E5 Zellen nachgewiesen werden.
- B** Nach Zugabe von FasL zeigen beide Zelllinien PARP Spaltung, die nach 2 h beginnt und bis zum Ende des Experimentes stetig zunimmt.

In A31-Neo Zellen begann die PARP Spaltung 2 h nach der TRAIL Zugabe und nahm bis zu einer gleichbleibenden Menge nach 4 und 8 h zu. In den E5-exprimierenden Zellen konnte keine signifikante Spaltung nachgewiesen werden (Abb. 5.27A). Ein völlig anderes Bild zeigte sich, wenn Apoptose durch FasL ausgelöst wurde (Abb. 5.27B). Nach Zugabe von FasL konnte in beiden Zelllinien PARP Spaltung nachgewiesen werden, die nach 2 h begann und bis zum Ende des Experimentes stetig zunahm. Offensichtlich ist das E5 Protein des humanpathogenen Papillomvirus nicht in der Lage, Mausfibroblasten vor FasL-vermittelter Apoptose zu schützen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Hypothese, dass es verschiedene Mechanismen geben muss, durch die das HPV-16 E5 Protein humane Zielzellen vor TRAIL- und FasL-vermittelter Apoptose schützen kann.

6. Diskussion

6.1. Aktivierung der Signaltransduktion durch osmotischen Stress

Vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das HPV-16 E5 Protein dazu in der Lage ist, in die Wachstumsfaktor-vermittelte Signaltransduktion transfizierter und möglicherweise auch infizierter Zellen einzugreifen (Crusius et al., 1998, 2000; Pim et al., 1992; Straight et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob E5 auch die Stress-vermittelte Signaltransduktion beeinflussen kann (Abb. 1.5).

Als Auslöser wurde eine hyperosmolare Konzentration von 0,6 M Sorbitol verwendet, was zu einem Verlust von Zellvolumen führt. Bei Sorbitol handelt es sich um einen Alkoholzucker, der nicht toxisch und nicht ionisierbar ist. Sorbitol kann auch in der Zelle selbst durch die Aldosereduktase gebildet werden, der Glukose als Substrat dient. Dabei wirkt Sorbitol als Osmolyt dem Entzug von Wasser aus der Zelle entgegen (Lang et al., 1998).

Durch diesen osmotischen Schock wurden die Stresskinasen p38 und JNK aktiviert, wie mittels eines *in vitro* Kinaseaktivitäts-Assays dargestellt wurde (Abb. 5.2). Im Unterschied zu den Kontrollzellen HaCaT/pMSG war die Aktivierung der Kinasen in den HaCaT/E5 Zellen jedoch geringer. Es stellte sich daher die Frage, wodurch diese Unterschiede verursacht werden.

Da die beiden Kinasen auf verschiedenen Wegen aktiviert werden, wurde nach einem gemeinsamen Auslöser der Kaskaden gesucht (Abb. 1.5). Dafür boten sich die kleinen G-Proteine der Rho-Familie an, die im aktivierten GTP-gebundenem Zustand membranassoziiert vorliegen. In der Tat zeigten sich auch hier deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien, allerdings waren die untersuchten G-Proteine Cdc42 und Rac1 in den HaCaT/E5 Zellen stärker aktiviert als in den Vergleichszellen HaCaT/pMSG (Abb. 5.3).

Eine Inhibierung der G-Proteine durch Toxin B von *Clostridium difficile* mit anschließender Sorbitol-Behandlung führte zu einer stärkeren Phosphorylierung von p38 als Sorbitol allein. Durch die Inhibierung mit Toxin B konnte sogar ohne anschließende Sorbitol-Behandlung eine schwache p38 Aktivierung beobachtet werden (Abb. 5.5). Die Aktivierung von JNK durch Sorbitol wurde durch Toxin B ebenfalls nicht negativ beeinflusst. Daraus ließe sich schließen, dass die

G-Proteine einen negativen Einfluss auf die Signalkaskaden haben, die zur Aktivierung der Stresskinasen p38 und JNK führen bzw. dass es möglicherweise zusätzliche oder alternative Wege gibt, die unabhängig von den G-Proteinen sind.

Dies ist äußerst schwierig zu untersuchen, da durch osmotischen Schock eine Vielzahl verschiedener Antworten in der Zelle ausgelöst werden. So wird z.B. auch der EGFR durch Sorbitol aktiviert und ebenso die folgende Kaskade über Ras, Raf, MEK1 bis zur MAP Kinase p42/44, obwohl Sorbitol kein Ligand des Rezeptors ist (nicht gezeigt). Die Behandlung mit Toxin B verstärkt hier die Aktivierung des EGFR durch Sorbitol, wie das auch für p38 und JNK der Fall war. Da Ras nicht durch Toxin B inhibiert werden kann, wäre eine verstärkte Phosphorylierung von p42/44 zu erwarten. Allerdings wird die Aktivierung von p42/44 durch Sorbitol nach Behandlung mit Toxin B stark reduziert, d.h. hier scheinen die G-Proteine Cdc42 und Rac1 einen positiven Effekt auf die Aktivierung zu haben, möglicherweise über die Aktivierung von MEK1 (Kyriakis und Avruch, 2001).

Dies zeigt einmal mehr, wie komplex das Netzwerk der Signaltransduktion in der Zelle ist. Experimente mit Inhibitoren sind daher immer vorsichtig zu beurteilen, da durch Blockierung eines Weges ein anderer Pfad geöffnet wird und manche Inhibitoren in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration nicht immer spezifisch wirken. In Abbildung 6.1 ist ein Überblick über die Signaltransduktionswege so dargestellt wie man sie sich im Moment vorstellt.

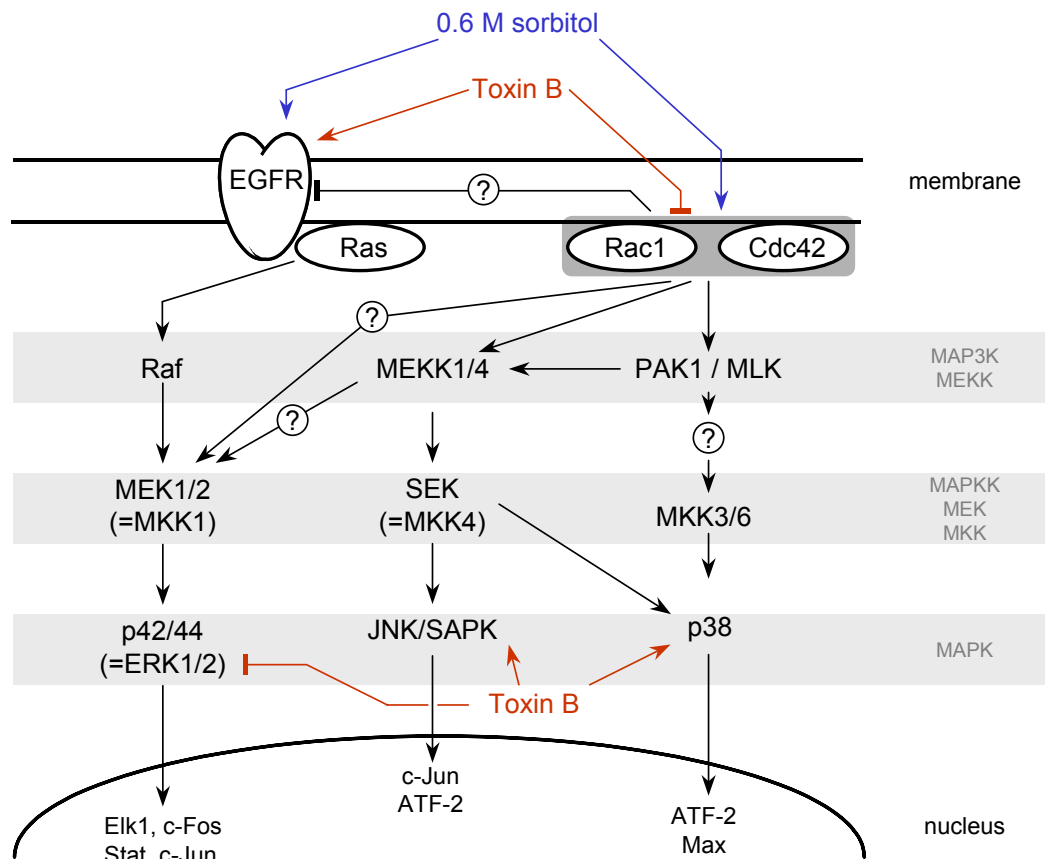


Abb 6.1: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege. Erläuterungen im Text.

Als nächstes stellte sich die Frage, wieso die G-Proteine Cdc42 und Rac1 in HaCaT/E5 Zellen stärker aktiviert sind als in den HaCaT/pMSG Zellen. Da die aktivierten GTP-gebundenen Formen membranassoziiert vorliegen und E5 ein Membranprotein ist, sollte untersucht werden, ob es eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen gibt.

Aufgrund fehlender Antikörper gegen das hydrophobe E5 Protein mussten Epitop-tragende E5 Proteine verwendet werden. Da sich HaCaT Zellen nur mit einer Effizienz von 5-15% transfizieren lassen, wurden Cos7 Zellen transient transfiziert und Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass E5 nicht nur mit Cdc42- und Rac1-spezifischen Antikörpern präzipitiert, sondern auch mit unspezifischem Serum oder monoklonalen Antikörpern, die gegen ein in der Zelle nicht vorhandenes Epitop gerichtet waren. Vermutlich kann E5 aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften unspezifisch an Immunglobuline binden.

Es sollten daher andere Methoden verwendet werden, um eine Interaktion nachzuweisen. So wurde die Verteilung von GFP-E5 und Rac1 bzw. Cdc42 in Cos7 Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht, doch auch mit dieser

Methode konnte keine eindeutige Co-Lokalisation zwischen den Proteinen nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des Overlay-Assays sollte in einem weiteren Ansatz untersucht werden, ob radioaktiv markiertes Cdc42 oder Rac1 als Sonde an auf PVDF Membran gebloTTetes E5 Protein binden kann (Abb. 5.6). Auch in diesem Versuch konnte keine Interaktion festgestellt werden, wobei es möglich wäre, dass das membrangebundene E5 Protein vielleicht nicht mehr in der Konformation vorliegt, in der eine Interaktion möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit keinem der Experimente eine direkte Interaktion zwischen E5 und Cdc42 bzw. Rac1 gezeigt werden konnte, so dass diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich betrachtet wird. Vielleicht hat die Expression von E5 einen Einfluss auf die GAPs (GTPase Activating Proteins) oder GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) und beeinflusst so auf indirektem Weg den Aktivitätszustand der G-Proteine.

Was für eine Bedeutung hat aber die stärkere Aktivierung von Cdc42 und Rac1 für die E5-exprimierende Zelle? Es ist bekannt, dass die kleinen G-Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Cytoskelettstruktur spielen; es wurde daher das Actin-Cytoskelett mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Tatsächlich ließen sich auch hier Unterschiede zwischen HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen feststellen.

Da die Signaltransduktion eng mit der Cytoskelettstruktur assoziiert ist, erscheint es einleuchtend, dass Veränderungen im Actin-Cytoskelett auch Auswirkungen in der Signalkaskade mit sich bringen. So könnten z.B. Kinasen länger aktiv bleiben, da die Phosphatasen, die normalerweise für eine rasche Inaktivierung sorgen, nicht mehr in räumliche Nähe gebracht werden. Oder aktivierte Rezeptoren verbleiben an der Zelloberfläche, da der Transport von Vesikeln gestört ist und es daher zu keiner Dephosphorylierung und Degradation kommen kann. In der Tat wurde bereits für C127 Mausfibroblasten beschrieben, dass in HPV-16 E5-exprimierenden Zellen der Transport von endocytierten Vesikeln inhibiert ist (Thomsen et al., 2000). Daher ist es gut möglich, dass die beobachteten vielseitigen Veränderungen in der Signaltransduktion E5-exprimierender Zellen indirekt auf einer Neuordnung des Actin-Cytoskeletts beruhen.

Desweiteren wurde beschrieben, dass die Aktivierung von Rac1 in HaCaT

Zellen ausreichend ist, die Cadherin-abhängige Zell-Zell Adhäsion zu zerstören (Braga et al., 2000). Die stärkere Aktivierung von Rac1 in E5-exprimierenden HaCaT Zellen könnte also möglicherweise dazu beitragen, dass die Zellen aus der Homöostase des Gewebeverbandes herausgelöst werden könnten. Außerdem findet man in CIN Läsionen, die eine E5 Expression zeigen, dass hier verstärkt EGF Rezeptoren exprimiert werden und gleichzeitig die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell Kommunikation zerstört ist (Wilding et al., 1996). Das könnte bedeuten, dass die infizierten Zellen nicht mehr über die Nachbarzellen kontrolliert werden, was einen ersten Schritt zur Tumorentstehung darstellen könnte.

6.2. Durch osmotischen Stress induzierte Apoptose

Nachdem also eine Wirkung von HPV-16 E5 auf die Stress-vermittelte Signaltransduktion beobachtet werden konnte, stellte sich nun die Frage nach der physiologischen Bedeutung für die Zelle. Eine Veränderung der Proliferation gemessen an der Cyclin A Expression konnte ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Da beschrieben worden war, dass die Aktivierung der Stresskinase p38 in Verbindung zur Apoptose steht (Ono und Han, 2000), sollte untersucht werden, ob E5 die Apoptose beeinflussen kann.

Zu diesem Zweck wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen einem Sorbitolschock von 30 min ausgesetzt, anschließend gewaschen und nach einer Erholungsphase von 30 min bis 4 h untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die humanen Keratinocyten (Abb. 5.8) wie auch Mausfibroblasten (Abb. 5.17), die E5 exprimierten, deutlich empfindlicher gegenüber dem osmotischen Schock reagierten und in Apoptose gingen als die jeweiligen Kontrollzellen ohne E5.

Da eine virale Infektion im allgemeinen nicht durch einen osmotischen Schock begleitet wird, kann die erhöhte Empfindlichkeit in E5-exprimierenden Zellen kein selektiver Vorteil für das Virus sein und stellt höchstwahrscheinlich keine physiologische Funktion des viralen Proteins dar. Vielmehr kann unsere Beobachtung als das Ergebnis eines Nebeneffektes von E5 gedeutet werden, der während einer natürlichen Infektion keine Relevanz besitzt. Dennoch kann dieser Effekt einen möglichen Schwachpunkt des Virus enthüllen, der eine selektive Schädigung HPV-16-infizierter Zellen erlauben könnte.

Der Mechanismus, durch den der Sorbitolschock Apoptose auslöst, ist unbekannt. Tatsache ist jedoch, dass durch Sorbitol sowohl der intrinsische mitochondriale Weg, als auch der extrinsische Todesrezeptor Weg ausgelöst werden kann, die beide in die Aktivierung von Caspase-3 münden (Abb. 5.8, 9).

Wie bereits für UV-behandelte HaCaT Zellen beschrieben worden war (Shimizu et al., 1999; Assefa et al., 2000), wurden die Wege unabhängig voneinander aktiviert, da Cytochrom c sofort nach dem Schock in einer p38-abhängigen Weise freigesetzt wurde (Abb. 5.10, 12), wohingegen Procaspase-8 Spaltung erst mit einer Verzögerung von 30 min einsetzte (Abb. 5.14). Außerdem konnte durch Inhibierung von p38 die Cytochrom c-Freisetzung deutlich reduziert werden (Abb. 5.12), aber die Caspase-3 Aktivierung wurde davon nicht beeinflusst (Abb. 5.13), was ebenfalls dafür spricht, dass Caspase-3 unabhängig über verschiedene Wege aktiviert wurde.

Obwohl eindeutig geklärt werden konnte, dass p38 in der Kaskade oberhalb der Cytochrom c-Freisetzung steht, kann die Aktivierung von p38 nicht der einzige Grund für die Freisetzung sein, da auch in HaCaT/pMSG Zellen p38 als Folge des osmotischen Schocks aktiviert wurde, was aber nicht für eine Freisetzung von Cytochrom c ausreichte.

Im Vergleich zu den HaCaT/E5 Zellen konnten sich die HaCaT/pMSG jedoch schneller wieder von dem Stress erholen, wie in Abbildung 5.11 durch die rasche Dephosphorylierung von p38 gezeigt werden konnte. Eine länger andauernde p38 Aktivierung scheint aber sowieso nicht für die Cytochrom c-Freisetzung nötig zu sein, da dieses sofort nach dem Schock freigesetzt wurde und dann nicht mehr nachweisbar war (Abb. 5.10). Das bedeutet, dass eine kontinuierliche Freisetzung für die Aufrechterhaltung des Apoptoseprozesses nicht notwendig ist. Möglicherweise wurde das freigesetzte Cytochrom c sofort mit Apaf-1 und Procaspase-9 in das Apoptosom eingebaut, was zur beobachteten Aktivierung von Caspase-9 führte (Abb. 5.10) und war daher nicht mehr nachweisbar.

Es mag noch zusätzlich andere Effekte geben, die das Gleichgewicht zwischen anti- und pro-apoptotischen Mechanismen nach Sorbitol-Behandlung beeinflussen. Wenn man nämlich die Kinetiken der Caspase-3 Aktivierung (Abb. 5.8) mit denen von Caspase-8 (Abb. 5.14) und Caspase-9 (Abb. 5.10)

genau vergleicht, so fällt auf, dass die Spaltung von Caspase-3 4 h nach dem Schock nachzulassen schien, wohingegen die Aktivierung von den oberhalb gelegenen Initiator Caspasen-8 und -9 nicht reduziert wurde. Diese Unterschiede könnten durch verschiedene Apoptoseregulatoren und/oder durch die Existenz zusätzlicher noch unbekannter Wege erklärt werden, worauf Studien an „Knockout“ Mäusen einen Hinweis gegeben haben (Earnshaw et al., 1999; Wang und Lenardo, 2000).

Wieso aber sind E5-exprimierende Zellen empfindlicher gegenüber Sorbitol-induzierter Apoptose? Vor kurzem wurde beschrieben, dass HPV-16 E5 in der Lage ist, primäre humane Vorhautkeratinocyten vor UV-vermittelter Apoptose zu schützen, indem die Aktivierung des EGFR erhöht wird (Zhang et al., 2002). Dies steht im Kontrast zu unseren Beobachtungen über die durch osmotischen Schock ausgelöste Apoptose. Dennoch wurde untersucht, ob die Aktivierung des EGFR durch Sorbitol einen Einfluss auf die Apoptose hatte, indem HaCaT/pMSG und E5 Zellen mit Tyrphostin AG 1478 behandelt wurden, bevor Sorbitol zu dem Inhibitor zugegeben wurde (Abb. 5.15). Obwohl eine deutliche Hemmung der Aktivität der EGFR durch den Inhibitor zu beobachten war, hatte dies keine signifikante Wirkung auf die Spaltung von Procaspase-8 (Abb. 5.15). Eine Inhibierung von MEK1 durch PD 98059 konnte die Sorbitol-induzierte Caspase-8 Spaltung ebenfalls nicht beeinflussen (nicht gezeigt), woraus sich schließen lässt, dass die EGFR-vermittelte Kaskade nicht involviert ist. Ebenso hatte die Behandlung mit Toxin B, die auch zu einer Inhibierung der EGFR führte (nicht gezeigt), keinen Effekt auf die Caspase-3 Aktivierung (Abb. 5.13).

Es ist denkbar, dass das stark hydrophobe HPV-16 E5 Protein die Zusammensetzung der Membranen so verändert, dass die Wirkung von Sorbitol verstärkt wird und die Zellen empfindlicher gegenüber Apoptose gemacht werden. In der Tat wurde bereits beschrieben, dass Zellen, die dieses virale Gen exprimieren, eine veränderte Phospholipid Zusammensetzung und Phospholipase Aktivität aufweisen (Crusius et al., 1999). Für Keratinocyten wurde eine enge Korrelation zwischen Membran-Fluidität und Temperatur berichtet (Hachisuka et al., 1990). Eine Möglichkeit wäre daher, dass der Einbau von E5 die Membran-Fluidität erhöht, was zu Veränderungen in der zellulären Antwort auf die Sorbitol-Behandlung in einer Temperatur-abhängigen

Weise führen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden HaCaT/pMSG und E5 Zellen mit Sorbitol bei 37°C und 22°C behandelt (Abb. 5.16). Dabei zeigte sich, dass in HaCaT/E5 Zellen auch bei 22°C noch Apoptose ausgelöst werden konnte, wie an dem Auftreten von PARP Spaltung gemessen wurde. Bei 10°C konnte auch in HaCaT/E5 Zellen keine PARP Spaltung mehr beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Kontrollzellen waren konsistent weniger empfindlich gegenüber der Sorbitol-Behandlung bei 37°C und 22°C. Die PARP Spaltung in HaCaT/E5 Zellen schien weniger stark durch die Temperaturerniedrigung beeinträchtigt zu werden, als in den Kontrollzellen. Allerdings ist die verwendete Technik nicht genau genug, um die Unterschiede in der PARP Spaltung quantifizieren zu können, da natürlich bei niedrigerer Temperatur auch die enzymatische Aktivität beeinträchtigt ist.

Um zu zeigen, dass die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber osmotischem Stress nicht nur auf die polyklonale HaCaT/E5 Zelllinie beschränkt ist, wurde zusätzlich die Wirkung von E5 in der Mausfibroblasten Zelllinie A31 untersucht (Abb. 5.17). Auch hier zeigte sich, dass die polyklonalen A31-E5 Zellen stärker in Apoptose gingen, womit die erhöhte Empfindlichkeit auf die Anwesenheit von E5 zurückzuführen ist.

Auch wenn es sich bei der hier beschriebenen Wirkung von HPV-16 E5 auf die Sorbitol-induzierte Apoptose höchstwahrscheinlich nicht um eine physiologische Funktion des viralen Proteins handelt, so führen die Beobachtungen möglicherweise zu einem Ansatzpunkt für eine antivirale Strategie, der sich therapeutisch nutzen lassen könnte (z.B. als Gebärmutter-Spülungen mit Sorbitol).

6.3. Durch die Liganden TRAIL und FasL induzierte Apoptose

Nachdem also festgestellt wurde, dass HPV-16 E5 die durch unspezifischen Sorbitolschock ausgelöste Apoptose beeinflusst, sollte untersucht werden, ob E5 auch eine Wirkung auf die durch spezifische Liganden der Todesrezeptoren ausgelöste Apoptose hat.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gehört HPV-16 zu der Gruppe der „high risk types“, welche die Genitalschleimhäute infizieren. Da auf dem Zielgewebe des Virus TRAIL und Fas Rezeptoren exprimiert werden (Das et al., 2000; Ryu et al., 2000), wurden diese Liganden verwendet, um Apoptose auszulösen.

Dabei stellte sich heraus, dass E5 die TRAIL- und FasL-vermittelte Apoptose verhindern kann (Abb. 5.18, 19, 26), was eine Hauptfunktion des viralen Proteins darstellen könnte. In der Tat ist E5 in einem frühen Stadium der Infektion, wenn das virale Genom episomal vorliegt, eines der häufigsten mRNA Transkripte (Kell et al., 1994; Stoler et al., 1992).

Proliferation und Regression des gynäkologischen Gewebes wie Ovar, Endometrium und Cervix sind Hormon-abhängig und Fas wird konstitutiv in diesen Zellen exprimiert (Leithäuser et al., 1993), die das natürliche Ziel des Virus darstellen. Untersuchungen zur Fas Expression in gynäkologischen Krebsen haben gezeigt, dass eine Herunterregulierung dieses Todesrezeptors eine häufig vorkommende Abnormalität in diesen Geweben darstellt (Das et al., 2000). Die reduzierte Menge an Fas Rezeptoren und die daraus folgende Resistenz gegenüber FasL-vermittelter Apoptose könnte Tumorzellen dazu befähigen, der Immunüberwachung zu entkommen (Zörnig et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in HPV-16 E5-exprimierenden Keratinocyten die Oberflächenexpression von Fas deutlich reduziert ist im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 5.23). Auch für andere Viren, wie dem Adenovirus, wurde beschrieben, dass ein Verlust von Fas Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch virale Proteine herbeigeführt werden kann (Shisler et al., 1997; Tollefson et al., 1998).

Allgemein führt eine Reduktion der Anzahl an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit, dass die Ligand-Moleküle ihr Ziel erreichen, wodurch die Zellen weniger empfindlich gegenüber Apoptose werden. Die Tatsache, dass die Fas Oberflächenexpression in HaCaT/E5 Zellen reduziert ist, legt nahe, dass HPV-16 E5 dieses Prinzip ausnutzt, um infizierte humane Keratinocyten vor FasL-vermittelter Apoptose zu schützen. Um in der vorliegenden Arbeit die Schutzfunktion von E5 zu demonstrieren, wurden HaCaT Zellen jedoch mit einer so hohen Konzentration an FasL behandelt, dass diese vermutlich die physiologischen Mengen bei weitem übertrifft. Nach den Herstellerangaben (Alexis) reichen nämlich auch 30 bis 150fach niedrigere Konzentrationen aus, um in A20 B Lymphomzellen Apoptose auszulösen. Dieser Überschuss führt zu einer Sättigung der Rezeptoren mit Ligand-Molekülen, wodurch möglicherweise erklärt werden

könnte, warum in HaCaT/E5-Dex Zellen trotz reduzierter Fas Oberflächenexpression (Tab. 5.1) Apoptose auftritt (Abb. 5.26).

Offensichtlich müssen noch zusätzliche Mechanismen existieren, welche die Weiterleitung des apoptotischen Signals verhindern und dabei von der E5-Konzentration abhängig sind (Abb. 5.26). Z.B. exprimieren HaCaT/E5+Dex Zellen weniger Fas Gesamtprotein als HaCaT/E5-Dex oder HaCaT/pMSG Zellen (Tab. 5.1), was möglicherweise auf eine forcierte Degradation der Fas Proteine zurückzuführen sein könnte. Für Adenovirus-infizierte Zellen wurde eine solche forcierte Degradation der Fas Rezeptoren beschrieben, die zu einem Schutz vor Apoptose führte (Tollefson et al., 1998).

Eine veränderte Genexpression von Fas, wie sie von Fenton et al. (1998) beschrieben worden war, trifft hier nicht zu (Tab. 5.1), obwohl eine erhöhte Menge an aktiviertem GTP-gebundenem Ras in HaCaT/E5 Zellen gefunden wurde (Abb. 5.25). Wie durch Northern Blot Analyse gezeigt wurde, blieb die Menge an Fas mRNA im wesentlichen durch die E5 Expression unbeeinflusst (Tab. 5.1).

Es bleibt jedoch ungelöst, wie die geringe E5-Konzentration in HaCaT/E5-Dex Zellen ausreichend sein kann, um die gleiche reduzierte Menge an Fas Oberflächenexpression zu erhalten, wie in HaCaT/E5+Dex Zellen gefunden wurde (Abb. 5.23). Es ist denkbar, dass unter physiologischen Bedingungen die reduzierte Oberflächenexpression und Gesamtmenge an Fas in Kombination zu einem wirksamen Schutz vor FasL-vermittelter Apoptose führen.

Zusätzlich zu den Fas Rezeptoren spielen TRAIL und die TRAIL Rezeptoren eine Rolle in einer Vielzahl von viralen Infektionen (Sedger et al., 1999; Vidalain et al., 2000; Clarke et al., 2000; Tollefson et al., 2001). Zum Beispiel wird die TRAIL-induzierte Apoptose in Adenovirus-infizierten Zellen durch eine verstärkte Internalisierung von DR4 verhindert (Tollefson et al., 2001). Die TRAIL Rezeptoren 1, 2 und 3 wurden sowohl in normalem Zervixepithel als auch in Tumorzellen gefunden (Ryu et al., 2000). Im Gegensatz zur Herunterregulierung der Fas Rezeptor Expression (Das et al., 2000) konnte keine Reduzierung der TRAIL Rezeptor Expression in Tumorzellen beobachtet werden (Ryu et al., 2000). Dies steht im Einklang zu den hier gefundenen Ergebnissen.

Es konnte gezeigt werden, dass HPV-16 E5 die TRAIL-vermittelte Apoptose durch einen anderen Mechanismus als den für Fas inhibieren muss, da sowohl die Oberflächen- als auch die Gesamtexpression der DR4 und DR5 sehr ähnlich in HaCaT/E5 und HaCaT/pMSG Zellen sind (Abb. 5.23, 24).

Da die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien in Bezug auf die TRAIL-induzierte Apoptose bereits auf Höhe der Caspase-8 Aktivierung zu beobachten waren, aber die Rezeptor Expression annähernd gleich war, wurde vermutet, dass E5 in die DISC Formation eingreift. In Abbildung 6.2 ist schematisch ein Modell der DISC Formation mit möglichen Angriffsstellen von E5 gezeigt.

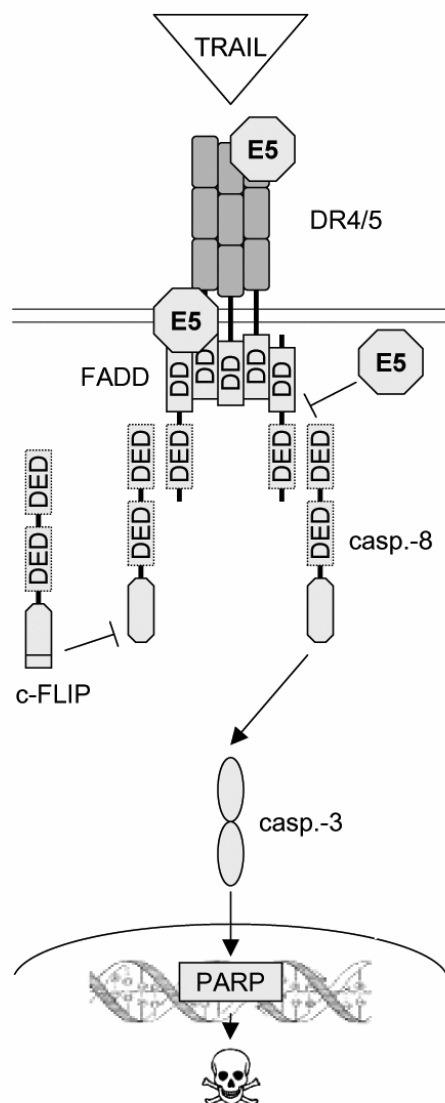


Abb. 6.2: Schematisches Modell der Einwirkung von E5 auf die DISC Formation. Es sind drei mögliche Interaktionsstellen zwischen E5 und dem DISC gezeigt, durch welche die Signalkette der Apoptose oberhalb der Caspase-8 Aktivierung unterbrochen werden könnte. Das Modell ist im Text beschrieben.

Die Bindung von TRAIL an DR4 und DR5 führt zu einer Rezeptor Trimerisierung, wodurch eine Interaktionsplattform für die „Death Domain“ (DD) tragenden Adapterproteine wie FADD geschaffen wird. Durch eine homotypische Interaktion bindet die DD von FADD an die DD der Rezeptoren. Über die „Death Effector Domain“ (DED) rekrutiert FADD Procaspase-8, welche durch die induzierte räumliche Nähe zu anderen Procaspase-8 Molekülen autokatalytisch aktiviert wird. Die Aktivierung dieser Initiator Caspase führt wiederum zur Aktivierung von Effektor Caspasen wie Caspase-3, die dann das apoptotische Programm durchführen. Eines der Substrate von Caspase-3 ist das DNA Reparaturenzym Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP). Die Signalkette der Apoptose kann durch c-FLIP unterbrochen werden, welches eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Caspase-8 aufweist und an die DED von FADD mit einer höheren Affinität als Caspase-8 bindet (Scaffidi et al., 1999; Krueger et al., 2001). Die Bindung von c-FLIP verhindert so die weitere Rekrutierung von Caspase-8 in den Komplex. In der Folge kommt es zur Spaltung von c-FLIP, die zu einer Freisetzung einer Caspase-ähnlichen, aber proteolytisch inaktiven Untereinheit führt.

Eine Möglichkeit wäre, dass E5 in der Zelle zu einer Überexpression dieses Apoptoseinhibitors führt, was aber nicht der Fall zu sein scheint (Abb. 5.22). Obwohl E5 nicht zu einer Herunterregulierung in der DR4 und DR5 Expression führt, ist es denkbar, dass E5 die Funktionalität der Rezeptoren beeinträchtigt. DR4 und DR5 liegen hauptsächlich mit dem Golgi Netzwerk assoziiert vor (Zhang et al., 2000). Da das hydrophobe E5 Protein ebenfalls in den Membranen des ER und Golgi lokalisiert ist (Conrad et al., 1993), könnte es dort möglicherweise während der posttranslationalen Prozessierung und des Transports der Rezeptoren an diese binden. Dies könnte dazu führen, dass die Rezeptoren nicht mehr in der Lage sind, TRAIL zu binden oder das Signal über das FADD Protein weiterzuleiten.

Konsistent mit dem hohen Grad an Homologie zwischen humanen und murinen Proteinen, was die Todesrezeptoren mit einschließt, gehen sowohl HaCaT/pMSG als auch A31-Neo Zellen nach Induktion mit humanem TRAIL und Fas Ligand in Apoptose. Offenbar können die murinen Rezeptoren die humanen Homologe ihrer spezifischen Liganden gleich gut binden.

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass HPV-16 E5 A31 Zellen vor TRAIL-vermittelter Apoptose schützen kann (Abb. 5.27A). Das bedeutet, dass dieser Effekt des viralen Proteins nicht allein auf HaCaT Zellen (Abb. 5.20) beschränkt ist.

Im Gegensatz dazu konnte nach FasL-Behandlung keine solche Resistenz in A31-E5 Zellen gefunden werden (Abb. 5.27B). Es ist vorstellbar, dass die komplexen Mechanismen, die HPV-16 E5 verwendet, um vor FasL-vermittelter Apoptose zu schützen, für humane Keratinocyten optimiert und nicht in den murinen A31 Zellen anwendbar sind. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass E5 die TRAIL- und FasL-vermittelte Apoptose durch verschiedene Mechanismen verhindern kann.

Viele Viren haben anti-apoptotische Mechanismen entwickelt, die der Wirtszelle erlauben, lange genug für die Virusreplikation am Leben zu bleiben (O'Brien et al., 1998; Teodoro und Branton, 1997). Die Anwesenheit von Fas und TRAIL Rezeptoren im Zielgewebe lässt es plausibel erscheinen, dass HPV-16 Mechanismen entwickelt hat, um der Immunüberwachung zu entgehen, welche sonst wahrscheinlich in der Lage wäre, infizierte Zellen in einem frühen Stadium des viralen Lebenszyklus zu entdecken. Zusätzlich zu der bekannten Funktion von E6, welches die intrinsische p53-abhängige Apoptose verhindert, konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass E5 vor der extrinsischen Ligand-vermittelten Apoptose schützt, wie für TRAIL und FasL untersucht wurde. Auf der anderen Seite kann die Unterdrückung von Apoptose zu transformierten Zellen führen, die dann nicht mehr fähig sind, die Virusproduktion zu unterstützen. Es ist jedoch bekannt, dass nur ein kleiner Teil der HPV-16-infizierten Zellen wirklich malignisiert (Biswas et al., 1997; Hildesheim et al., 1994). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es ein selektiver Vorteil für dieses kleine Virus zu sein scheint, in seinem Genom für zwei Proteine, nämlich E5 und E6 zu codieren, die sicherstellen, dass die korrekte Umgebung für die Virusreplikation gewährleistet bleibt.

7. Zusammenfassung

Das humane Papillomvirus Typ 16 ist ein kleines DNA-Virus, das mit ca. 8000 bp für sechs frühe („early“, E) Funktions- und zwei späte („late“, L) Strukturproteine codiert, wobei E5 das einzige Membranprotein des Virus darstellt. Es konnte bisher nachgewiesen werden, dass das E5 Protein in der Lage ist, die Wachstumsfaktor (EGF)-vermittelte Signaltransduktion zu verstärken und die Zell-Zell Kommunikation durch Veränderung der „gap-junctions“ zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass E5 auch EGF-unabhängig die durch osmotischen Stress induzierte Signaltransduktion beeinflussen kann. Dabei wurde entdeckt, dass die G-Proteine der Rho-Familie, Rac1 und Cdc42, in E5-exprimierenden Zellen stärker aktiviert vorliegen, was eine Veränderung der Cytoskelettstruktur zur Folge hat. Dadurch könnten möglicherweise die Zell-Zell Adhäsion und eine Vielzahl an Signaltransduktions-Prozessen in der Zelle gestört werden, was einen ersten Schritt zur Tumorentstehung darstellen könnte.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HPV-16 E5 die Zellen für Apoptose, ausgelöst durch osmotischen Schock, empfindlicher macht. Dabei ist anzunehmen, dass es sich bei diesem Effekt nicht um eine eigentliche Funktion von E5 handelt, sondern vielmehr um einen Nebeneffekt, der auf einer durch E5 vermittelten Destabilisierung der Membranen beruht. Unter physiologischen Bedingungen kann diese Wirkung jedoch toleriert werden, da in einer natürlichen Infektion ein solcher Sorbitolschock nicht auftritt. Möglicherweise bietet diese Entdeckung aber eine Gelegenheit, HPV-16-infizierte Zellen gezielt zu schädigen.

Untersuchungen der spezifischen Ligand-vermittelten Apoptose ergaben weiterhin, dass E5 vor TRAIL- und FasL-vermittelter Apoptose schützt. Dabei konnte gezeigt werden, dass E5 verschiedene Mechanismen benutzt, um Apoptose zu verhindern. Im Fall von FasL wurde die Oberflächen- und Gesamtexpression der Fas Rezeptoren reduziert, wobei mehrere Mechanismen, die unterschiedliche Konzentrationen an E5 Proteinen benötigten, zu der Resistenz gegenüber Apoptose beitrugen. Im Fall von TRAIL wurde die Expression der TRAIL Rezeptoren nicht beeinflusst; vielmehr konnte gezeigt werden, dass die TRAIL-vermittelte DISC Formation inhibiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde damit eine Hauptfunktion des E5 Proteins gefunden, das zusätzlich zu dem viralen E6 Protein, welches vor der intrinsischen p53-vermittelten Apoptose schützt, infizierte Zellen vor extrinsischer Apoptose zu bewahren vermag.

8. Referenzen

1. **Adam, J. L., M. W. Briggs, and D. J. McCance.** 2000. A mutagenic analysis of the E5 protein of human papillomavirus type 16 reveals that E5 binding to the vacuolar H⁺-ATPase is not sufficient for biological activity, using mammalian and yeast expression systems. *Virology* **272**:315-325.
2. **Aragane, Y., D. Kulms, D. Metze, G. Wilkes, B. Pöppelmann, T. A. Luger, and T. Schwarz.** 1998. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J. Cell Biol.* **140**:171-182.
3. **Assefa, Z., A. Vantieghem, M. Garmyn, W. Declercq, P. Vandenabeele, J. R. Vandenheede, R. Bouillon, W. Merlevede, and P. Agostinis.** 2000. p38 mitogen-activated protein kinase regulates a novel, caspase-independent pathway for the mitochondrial Cytochrome c release in Ultraviolet B radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**:21416-21421.
4. **Auvinen, E., K. Crusius, B. Steuer, and A. Alonso.** 1997. Human papillomavirus type 16 E5 protein (Review). *Int. J. Oncol.* **11**:1297-1304.
5. **Benard, V., B. P. Bohl, and G. M. Bokoch.** 1999. Characterization of Rac and Cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* **274**:13198-13204.
6. **Biswas, C., B. Kell, C. Mant, R. J. Jewers, J. Cason, P. Muir, K. S. Raju, and J. M. Best.** 1997. Detection of human papillomavirus type 16 early-gene transcription by reverse transcription-PCR is associated with abnormal cervical cytology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1560-1564.
7. **Boquet, P., P. Munro, C. Fiorentini, and I. Just.** 1998. Toxins from anaerobic bacteria: specificity and molecular mechanisms of action. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:66-74.
8. **Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**:761-771.
9. **Bouvard, V., G. Matlashewski, Z. M. Gu, A. Storey, and L. Banks.** 1994. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* **203**:73-80.
10. **Braga, V. M. M., M. Betson, X. Li, and N. Lamarche-Vane.** 2000. Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt Cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell* **11**:3703-3721.

11. **Braunstein, T. H., B. S. Madsen, B. Gavnholt, M. W. Rosenstierne, C. Koefoed Johnsen and B. Norrild.** 1999. Identification of a new promoter in the early region of the human papillomavirus type 16 genome. *J. Gen. Virol.* **80**:3241-3250.
12. **Burbelo, P. D., D. Drechsel, and A. Hall.** 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**:29071-29074.
13. **Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, and X. Wang.** 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:269-290.
14. **Cano, E. and L. C. Mahadevan.** 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**:117-122.
15. **Chang, J. L., Y. P. Tsao, D. W. Liu, S. J. Huang, W. H. Lee, and S. L. Chen.** 2001. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. *J. Biomed. Sci.* **8**:206-213.
16. **Chen, S.-L., C.-H. Huang, T.-C. Tsai, K.-Y. Lu, and Y.-P. Tsao.** 1996. The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch. Virol.* **141**:791-800.
17. **Clarke, P., S. M. Meintzer, S. Gibson, C. Widmann, T. P. Garrington, G. L. Johnson, and K. L. Tyler.** 2000. Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL. *J. Virol.* **74**:8135-8139.
18. **Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel.** 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* **67**:6170-6178.
19. **Conrad-Stöppler, M., S. W. Straight, G. Tsao, R. Schlegel, and D. J. McCance.** 1996. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* **223**:251-254.
20. **Corden, S. A., L. J. Sant-Cassia, A. J. Easton, and A. G. Morris.** 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* **52**:275-282.
21. **Crusius, K., E. Auvinen, B. Steuer, H. Gaissert, and A. Alonso.** 1998. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp. Cell Res.* **241**:76-83.
22. **Crusius, K., M. Kaszkin, V. Kinzel, and A. Alonso.** 1999. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates phospholipase C- γ -1 activity and phosphatidyl inositol turnover in mouse fibroblasts. *Oncogene* **18**:6714-6718.

23. **Crusius, K., I. Rodriguez, and A. Alonso.** 2000. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes* **20**:65-69.
24. **Da Silva, D. M., M. P. Velders, J. D. Nieland, J. T. Schiller, B. J. Nickoloff, and W. M. Kast.** 2001. Physical interaction of human papillomavirus-like particles with immune cells. *Int. Immunol.* **13**:633-641.
25. **Das, H., T. Koizumi, T. Sugimoto, S. Chakraborty, T. Ichimura, K. Hasegawa, and R. Nishimura.** 2000. Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real-time quantitative RT-PCR. *Br. J. Cancer* **82**:1682-1688.
26. **Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford.** 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**:824-827.
27. **Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow.** 1998. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**:934-937.
28. **Earnshaw, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann.** 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:383-424.
29. **Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee, and P. R. Young.** 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **273**:14363-14367.
30. **Faulkner-Valle, G., and L. Banks.** 1995. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J. Gen. Virol.* **76**:1239-1245.
31. **Fenton, R. G., J. A. Hixon, P. W. Wright, A. D. Brooks, and T. J. Sayers.** 1998. Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras. *Cancer Res.* **58**:3391-3400.
32. **Ferenczy, A., and E. Franco.** 2002. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* **3**:11-16.
33. **Fesik, S. W.** 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* **103**:273-282.
34. **Filippova, M., H. Song, J. L. Connolly, T. S. Dermody, and P. J. Duerksen-Hughes.** 2002. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects from TNF-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**:21730-21739.

35. **Frattini, M. G., and L. A. Laimins.** 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* **204**:799-804.
36. **Giroglou, T., L. Florin, F. Schäfer, R. E. Streeck, and M. Sapp.** 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **75**:1565-1570.
37. **Hachisuka, H., H. Nomura, O. Mori, S. Nakano, K. Okubo, M. Kusuhara, M. Karashima, E. Tanikawa, M. Higuchi, and Y. Sasai.** 1990. Alterations in membrane fluidity during keratinocyte differentiation measured by fluorescence polarization. *Cell Tissue Res.* **260**:207-210.
38. **Hengartner, M. O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-776.
39. **Hildesheim, A., M. H. Schiffman, P. E. Gravitt, A. G. Glass, C. E. Greer, T. Zhang, D. R. Scott, B. B. Rush, P. Lawler, M. E. Sherman, R. J. Kurman, and M. M. Manos.** 1994. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis.* **169**:235-240.
40. **Huang, P. S., D. R. Patrick, G. Edwards, P. J. Goodhart, H. E. Huber, L. Miles, V. M. Garsky, A. Oliff, and D. C. Heimbrook.** 1993. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**:953-960.
41. **Hymowitz, S. G., H. W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R. F. Kelley, A. Ashkenazi, and A. M. de Vos.** 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell* **4**:563-571.
42. **Jeon, S., and P. F. Lambert.** 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1654-1658.
43. **Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson, and G. G. Poirier.** 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**:3976-3985.
44. **Kell, B., R. J. Jewers, J. Cason, F. Pakarian, J. N. Kaye, and J. M. Best.** 1994. Detection of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides. *J. Gen. Virol.* **75**:2451-2456.

45. **Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim, and A. Ashkenazi.** 2000. Apo2L/TRAIL -dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**:611-620.
46. **Koefoed Johnsen, C., M. Stanley, and B. Norrild.** 1995. Analysis of human papillomavirus type 16 E5 oncogene expression in vitro and from bicistronic messenger RNAs. *Intervirology* **38**:339-345.
47. **Krueger, A., S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff.** 2001. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **21**:8247-8254.
48. **Kyriakis, J. M., and J. Avruch.** 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**:807-869.
49. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
50. **Lang, F., G. L. Busch, M. Ritter, H. Völkl, S. Waldegger, E. Gulbins, and D. Häussinger.** 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* **78**:247-306.
51. **Leechanachai, P., L. Banks, F. Moreau, and G. Matlashewski.** 1992. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene* **7**:19-25.
52. **Leithäuser, F., J. Dhein, G. Mechtersheimer, K. Koretz, S. Brüderlein, C. Henne, A. Schmidt, K-M. Debatin, P. H. Krammer, and P. Möller.** 1993. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab. Invest.* **69**:415-429.
53. **Leptak, C., S. Ramon y Cajal, R. Kulke, B. H. Horwitz, D. J. Riese II, G. P. Dotto, and D. DiMaio.** 1991. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **65**:7078-7083. [Correction: *J. Virol.* **66**:1833]
54. **McMurray, H. R., D. Nguyen, T. F. Westbrook, and D. J. McAnce.** 2001. Biology of human papillomaviruses. *Int. J. Exp. Pathol.* **82**:15-33.
55. **Mayer, T. J., and C. Meyers.** 1998. Temporal and spatial expression of the E5a protein during the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31b. *Virology* **248**:208-217.
56. **Melnick, J. L., A. C. Allison, J. S. Butel, W. Eckhart, B. E. Eddy, S. Kit, A. J. Levine, J. A. R. Miles, J. S. Pagano, L. Sachs, and V. Vonka.** 1974. Papovaviridae. *Intervirology* **3**:106-120.

57. **Meyers, C., T. J. Mayer, and M. A. Ozbun.** 1997. Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *J. Virol.* **71**:7381-7386.
58. **O'Brien, V.** 1998. Viruses and apoptosis. *J. Gen. Virol.* **79**:1833-1845.
59. **Oelze, I., J. Kartenbeck, K. Crusius, and A. Alonso.** 1995. Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line. *J. Virol.* **69**:4489-4494.
60. **Ono, K., and J. Han.** 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* **12**:1-13.
61. **Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V. M. Dixit.** 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**:111-113.
62. **Pan, G., J. Ni, Y. F. Wei, G.-L. Yu, R. Gentz, and V. M. Dixit.** 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**:815-818.
63. **Pan, G., J. Ni, G.-L. Yu, Y. F. Wei, and V. M. Dixit.** 1998. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. *FEBS Lett.* **424**:41-45.
64. **Paul, A., S. Wilson, C. M. Belham, C. J. M. Robinson, P. H. Scott, G. W. Gould, and R. Plevin.** 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell. Signal.* **9**:403-410.
65. **Pim, D., M. Collins, and L. Banks.** 1992. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* **7**:27-32.
66. **Rich, T., R. L. Allen, and A. H. Wyllie.** 2000. Defying death after DNA damage. *Nature* **407**:777-783.
67. **Roberts, S., I. Ashmole, L. J. Gibson, S. M. Rookes, G. J. Barton, and P. H. Gallimore.** 1994. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J. Virol.* **68**:6432-6445.
68. **Rodriguez, M. I., M. E. Finbow, and A. Alonso.** 2000. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene* **19**:3727-3732.
69. **Ryu, H. S., K. H. Chang, S. J. Chang, M. S. Kim, H. J. Joo, and K. S. Oh.** 2000. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) receptors in cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **10**:417-424.

70. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
71. **Scaffidi, C., J. P. Medema, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1997. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J. Biol. Chem.* **272**:26953-26958.
72. **Scaffidi, C., I. Schmitz, P. H. Krammer, and M. E. Peter.** 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**:1541-1548.
73. **Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-1136.
74. **Schneider, P., J.-L. Bodmer, N. Holler, C. Mattmann, P. Scuderi, A. Terskikh, M. C. Peitsch, and J. Tschopp.** 1997. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas Ligand interaction. *J. Biol. Chem.* **272**:18827-18833.
75. **Schneider, P., M. Thome, K. Burns, J.-L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler, and J. Tschopp.** 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- κ B. *Immunity* **7**:831-836.
76. **Schoop, V. M., N. Mirancea, and N. E. Fusenig.** 1999. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **112**:343-353.
77. **Sedger, L. M., D. M. Shows, R. A. Blanton, J. J. Peschon, R. G. Goodwin, D. Cosman, and S. R. Wiley.** 1999. IFN- γ mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J. Immunol.* **163**:920-926.
78. **Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi.** 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**:818-821.
79. **Shimizu, H., Y. Banno, N. Sumi, T. Naganawa, Y. Kitajima, and Y. Nozawa.** 1999. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and caspases in UVB-induced apoptosis of human keratinocyte HaCaT cells. *J. Invest. Dermatol.* **112**:769-774.
80. **Shisler, J., C. Yang, B. Walter, C. F. Ware, and L. R. Gooding.** 1997. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**:8299-8306.

81. **Sprick, M. R., M. A. Weigand, E. Rieser, C. T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P. H. Krammer, and H. Walczak.** 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**:599-609.
82. **Stoler, M. H., C. R. Rhodes, A. Whitbeck, S. M. Wolinsky, L. T. Chow, and T. R. Broker.** 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.* **23**:117-128.
83. **Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance.** 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* **67**:4521-4532.
84. **Strasser, A., L. O'Connor, and V. M. Dixit.** 2000. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:217-245.
85. **Teodoro, J. G., and P. E. Branton.** 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J. Virol.* **71**:1739-1746.
86. **Thomsen, P., B. van Deurs, B. Norrild, and L. Kayser.** 2000. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene* **19**:6023-6032.
87. **Thompson, C. B.** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**:1456-1462.
88. **Tollefson, A. E., T. W. Hermiston, D. L. Lichtenstein, C. F. Colle, R. A. Tripp, T. Dimitrov, K. Toth, C. E. Wells, P. C. Doherty, and W. S. M. Wold.** 1998. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* **392**:726-730.
89. **Tollefson, A. E., K. Toth, K. Doronin, M. Kuppuswamy, O. A. Doronina, T. W. Hermiston, C. A. Smith, and W. S. M. Wold.** 2001. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J. Virol.* **75**:8875-8887.
90. **Tonon, S. A., M. A. Picconi, P. D. Bos, J. B. Zinovich, J. Galuppo, L. V. Alonio, and A. R. Teyssie.** 2001. Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J. Clin. Virol.* **21**:129-134.
91. **Trauth, B. C., C. Klas, A. M. J. Peters, S. Matzku, P. Möller, W. Falk, K.-M. Debatin, and P. H. Krammer.** 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**:301-305.
92. **Ullman, C. G., P. I. Haris, B. Kell, J. Cason, R. J. Jewers, J. M. Best, V. C. Emery, and S. J. Perkins.** 1994. Hypothetical structure of the membrane-associated E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *Biochem. Soc. Trans.* **22**:439.

93. **Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey.** 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**:2295-2322.
94. **Vidalain, P.-O., O. Azocar, B. Lamouille, A. Astier, C. Rabourdin-Combe, and C. Servet-Delprat.** 2000. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J. Virol.* **74**:556-559.
95. **Walczak, H., and P. H. Krammer.** 2000. The CD95(APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* **256**:58-66.
96. **Wang, J., and M. J. Lenardo.** 2000. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J. Cell Science* **113**:753-757.
97. **Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**:76-79.
98. **Wilding, J., K. H. Vousden, W. P. Soutter, P. D. McCrea, R. Del Buono, and M. Pignatelli.** 1996. E-cadherin transfection down-regulates the epidermal growth factor receptor and reverses the invasive phenotype of human papilloma virus-transfected keratinocytes. *Cancer Res.* **56**:5285-5292.
99. **Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C.-P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and R. G. Goodwin.** 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**:673-682.
100. **Yoon, C. S., K. D. Kim, S. N. Park, and S. W. Cheong.** 2001. α_6 Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**:668-673.
101. **Zhang, B., D. F. Spandau, and A. Roman.** 2002. E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J. Virol.* **76**:220-231.
102. **Zhang, X. D., T. Nguyen, W. D. Thomas, J. E. Sanders, and P. Hersey.** 2000. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett.* **482**:193-199.
103. **Zörnig, M., A. Grzeschiczek, M.-B. Kowalski, K.-U. Hartmann, and T. Möröy.** 1995. Loss of Fas/Apo-1 receptor accelerates lymphomagenesis in E μ L-*myc* transgenic mice but not in animals infected with MoMuLV. *Oncogene* **10**:2397-2401.
104. **Zur Hausen, H.** 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**:9-13.

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abb. 1.1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Papillomviren mit der charakteristischen Ikosaeder-Struktur	3
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des linearisierten Genoms von HPV-16	4
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Hautschichten und Virusvermehrung	5
Abb. 1.4:	Schematisches 3er Modul der MAPK Wege	10
Abb. 1.5:	Schematische Aktivierung der Stresskinasen JNK und p38	12
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der Hauptwege der Apoptose in Säugerzellen	15

5. Ergebnisse

Abb. 5.1:	Expression von E5 mRNA in HaCaT/E5 Zellen	52
Abb. 5.2:	<i>In vitro</i> Kinaseaktivität von p38 und JNK nach Sorbitol-Behandlung	53
Abb. 5.3:	Nachweis von GTP-Rac1 und GTP-Cdc42 in HaCaT/pMSG und E5 Zellen	55
Abb. 5.4:	Membranassoziation von Cdc42 in HaCaT/E5 und HaCaT/pMSG Zellen nach Sorbitol-Behandlung	56
Abb. 5.5:	Auswirkung der Inhibierung der G-Proteine durch Toxin B auf die Aktivierung von p38 und JNK nach Sorbitol-Behandlung	57
Abb. 5.6:	Interaktion von p ³² -γ-GTP GST-Cdc42 sowie GST-Rac1 mit dem E5 Protein	59
Abb. 5.7:	Veränderungen in der Actin-Cytoskelettstruktur in HaCaT/pMSG und E5 Zellen nach Sorbitol-Behandlung	61
Abb. 5.8:	Aktivierung von Caspase-3 nach Sorbitol-Behandlung	64
Abb. 5.9:	Morphologisches Erscheinungsbild apoptotischer, Caspase-3 positiver HaCaT Zellen nach Sorbitol-Behandlung	65
Abb. 5.10:	Cytochrom c-Freisetzung nach Sorbitol-Behandlung führt zur Aktivierung von Caspase-9	66
Abb. 5.11:	(De)phosphorylierung der aktivierten Stresskinase p38 nach Sorbitol-Behandlung	67
Abb. 5.12:	Verhinderung der Sorbitol-induzierten Cytochrom c-Freisetzung von p38 durch SB 203580	68
Abb. 5.13:	Auswirkung der Inhibierung von p38 durch SB 203580 auf die Sorbitol-induzierte Procaspase-3 Spaltung	69
Abb. 5.14:	Aktivierung von Caspase-8 nach Sorbitol-Behandlung	70
Abb. 5.15:	Sorbitol-induzierte Aktivierung von EGFR und Caspase-8 nach Inhibierung mit Tyrphostin AG 1478	71
Abb. 5.16:	PARP Spaltung nach Sorbitol-Behandlung bei 37°C und 22°C	73
Abb. 5.17:	PARP Spaltung in A31 Mausfibroblasten nach Sorbitol-Behandlung	74
Abb. 5.18:	Aktivierung von Caspase-3 nach FasL- und TRAIL-Behandlung in <i>Raft</i> -Kulturen	77
Abb. 5.19:	Aktivierung von Caspase-3 nach TRAIL- und FasL-Behandlung	78
Abb. 5.20:	Spaltung von Procaspase-8, -3 und PARP nach TRAIL-Behandlung	80
Abb. 5.21:	Spaltung von Procaspase-8 und PARP nach FasL-Behandlung	81
Abb. 5.22:	Einfluss von E5 auf die Expression von c-FLIP	82
Abb. 5.23:	Oberflächenexpression der Todesrezeptoren Fas, DR4 und DR5	83
Abb. 5.24:	Nachweis der TRAIL-induzierten DISC Formation durch Co-Immunpräzipitation von FADD	84
Abb. 5.25:	Nachweis von GTP-Ras in HaCaT/pMSG und HaCaT/E5 Zellen	86
Abb. 5.26:	Aktivierung von Caspase-3 nach 24 h FasL- oder TRAIL-Behandlung mit oder ohne Dexamethason-Induktion (+Dex, -Dex)	88
Abb. 5.27:	PARP Spaltung in A31 Mausfibroblasten nach TRAIL- und FasL-Behandlung	91

6. Diskussion

Abb. 6.1:	Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege	94
Abb. 6.2:	Schematisches Modell der Einwirkung von E5 auf die DISC Formation	102

9.2. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kirsten Kabsch
Adresse: Goethestr. 7
69221 Dossenheim

Geburtsdatum: 19.01.1974
Geburtsort: Los Angeles/USA
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1980-1984 Grundschule Dilsberg
1984-1993 Gymnasium Neckargemünd
12.05.1993 Allgemeine Hochschulreife mit der Gesamtnote „1,3“

WS 1993/94 Beginn des Studiums der Humanbiologie an der
Philipps-Universität Marburg
12.10.1995 Ablegen der mündlichen Diplom-Vorprüfungen in
den Fächern Biologie, Physik, Chemie, Anatomie,
Physiologie und Biochemie mit der Gesamtnote „gut“
05.08.1997 Ablegen der mündlichen Diplomprüfungen im
Hauptfach Virologie (Note „sehr gut“) und den
Nebenfächern Immunologie (Note „sehr gut“) und
Molekularbiologie (Note „gut“)
15.09.1997- Diplomarbeit am Institut für Virologie der Philipps-
10.09.1998 Universität Marburg unter der Leitung von
Prof. Dr. Radsak; Titel:
„Herstellung einer Virusmutante zur regulierbaren
Expression eines essentiellen Membranglykoproteins
des humanpathogenen Cytomegalievirus“
10.09.1998 Studienabschluss als Diplom-Humanbiologin,
Gesamtnote „sehr gut“

01.10.1998 Beginn der Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter Leitung von Prof. Dr. Alonso; Titel:
„Funktionelle Charakterisierung des humanpathogenen Papillomvirus Typ 16 E5 Proteins“

9.3. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aurich, Beato, Becker, Berndt, Brandis-Heep, Buckel, Elbel, Elsässer, Feldmann, Feuser, Fruhstorfer, Garten, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Herrler, Kern, Kirchner, Klenk, Knöller, Koolmann, Löffler, Lührmann, Müller, Niessing, Perst, Radsak, Risau, Röhm, Schäfer, Schrimpf, Schulz, Seitz J., Seitz K.-A., Slenczka, Steininger, Steinmetz, Thauer, von Löw, Voigt, Waßmuth

9.4. Danksagung

Für die Vergabe dieses interessanten Themas und die außergewöhnliche fachliche, wie persönliche Unterstützung bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Alonso am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Bei Herrn Prof. Dr. K. Radsak im Institut für Virologie am Medizinischen Zentrum für Hygiene und Mikrobiologie, Marburg, möchte ich mich für die konstruktiven Beiträge, sein fortwährendes Interesse an der Arbeit und für die Übernahme des Gutachtens bedanken; ohne seine Vertretung dieser Arbeit wäre die Promotion an der Philipps-Universität Marburg nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich meinen Kollegen Edgar Berger, Hao Cheng, Jürgen Fischer, Anoesjka Goessen, Michaela Hipp, Kerstin Leykauf, Xiaohong Mao, Margot Marques, Nerea Martinez, Nina Mossadegh, Monika Müller, Isabel Rodriguez und Holger Schlüter für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Für die tatkräftige Unterstützung möchte ich mich bei den Auszubildenden Stefanie Rösch, Ulrike Rothermel, Daniel Sandmaier und Martin Wühl bedanken.

Des weiteren bedanke ich mich bei Annette Kohl und Pascal Tomakidi für die gute Zusammenarbeit und wertvollen Vorschläge.

Meiner Familie und Paul Mertens danke ich für die liebevolle Unterstützung.

9.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Funktionelle Charakterisierung des humanpathogenen
Papillomvirus Typ 16 E5 Proteins“**

am Institut für Virologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. K. Radsak und Herrn Prof. Dr. A. Alonso ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den _____

(Kirsten Kabsch)